



T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIĞIR TÜBERKÜLOZUNDA OSTEOPONTİN ve SİRTUİN
AKTİVİTESİNİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK
İNCELENMESİ**

Mustafa SEVTEKİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman
Prof. Dr. Özlem ÖZMEN**

BURDUR-2016

T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIĞIR TÜBERKÜLOZUNDA OSTEOPONTİN ve SİRTUİN
AKTİVİTESİNİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK
İNCELENMESİ**

Mustafa SEVTEKİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN

Bu Araştırma Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0260-YL-15 proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR-2016

KABUL ve ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Mustafa SEVTEKİN tarafından *Prof. Dr. Özlem ÖZMEN* yönetiminde hazırlanan *Sığır Tüberkülozunda Osteopontin ve Sirtuin 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 / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi
29/01/2016

Doç.Dr.Zafer ÖZYILDIZ
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Patoloji Anabilim Dalı
Karumu
Başkan

Prof.Dr.Özlem ÖZMEN
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Patoloji Anabilim Dalı
Jüri

Prof.Dr.Şima ŞAHİNDURAN
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
İç Hastalıkları 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 12 / 02 / 2016 Tarih ve 2016/6 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. M. Doğa TEMİZSOYLU
Müdür
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam surecinde emek, destek, hoőgoru ve sabrını esirgemeyen tez danıőmanım Sayın Prof. Dr. Özlem ÖZMEN' e,

Yüksek lisans eđitimim suresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaőarak eđitimimde bana destek olan Patoloji Anabilim Dalı đretim yeleri Doç. Dr. Zafer ÖZYILDIZ ve Doç. Dr. Ahmet AYDOđAN' a,

Araştırma surecinde bana verdiği destek ve dostluğunu asla unutmayacağım dönem arkadaőım Veteriner Hekim M. Mustafa SEZđİNER' e ve diğer dönem arkadaőlarıma,

Yüksek lisans eğitimim boyunca gösterdiği sabır, anlayıő ve sevgi nedeniyle değerli eőim Gökçen SEVTEKİN' e ve biricik oğlum Selim' ime,

Teőekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

BEYAN

Sayfa

İK KAPAK

Sığır Dİ Tüberkülozunda Osteopontin ve Sirtuin Aktivitesinin İmmunohistokimyasal Olarak İncelenmesi başlıklı tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından 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 da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

1. GİRİŞ

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sığır Tüberkülozu Etkeninin Etiyolojisi

2.2. Sığır Tüberkülozunun Epidemiyolojisi

2.3. Sığır Tüberkülozunun Patojenitesi

2.4. Sığır Tüberkülozunun Histopatolojisi

2.5. Sığır Tüberkülozunun Teshis Yöntemleri

2.6. Osteopontin

2.6.1. Osteopontinin Yangıdaki Rolü

2.7. Sirtuin

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması

3.2. Laboratuvar Çalışmaları

3.2.1. Histopatolojik Yöntem

3.2.2. Ziehl-Neelsen Yöntemi

3.2.3. İmmunohistokimya

4. BULGULAR

4.1. Makroskobik Bulgular

4.2. Mikroskobik Bulgular

5. TARTISMA

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

ONAY

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN

29/01/2016

Mustafa SEVTEKİN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	<i>i</i>
KABUL ve ONAY	<i>ii</i>
TEŞEKKÜR	<i>iii</i>
BEYAN	<i>iv</i>
İÇİNDEKİLER	<i>v</i>
ŞEKİLLER DİZİNİ	<i>vii</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	2
2.1. Sığır Tüberkülozu Etkeninin Etiyolojisi	2
2.2. Sığır Tüberkülozunun Epidemiyolojisi	2
2.3. Sığır Tüberkülozunun Patogenezisi	4
2.4. Sığır Tüberkülozunun Histopatolojisi	5
2.5. Sığır Tüberkülozunun Teşhis Yöntemleri	5
2.6. Osteopontin	6
2.6.1. Osteopontinin Yangıdaki Rolü	7
2.7. Sirtuin	8
3. GEREÇ ve YÖNTEM	10
3.1. Örneklerin Toplanması	10
3.2. Laboratuvar Çalışmaları	10
3.2.1. Histopatolojik Yöntem	10
3.2.2. Ziehl-Neelsen Yöntemi	11
3.2.3. İmmunohistokimya	11
4. BULGULAR	13
4.1. Makroskobik Bulgular	13
4.2. Mikroskobik Bulgular	15
5. TARTIŞMA	29
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	32

7. KAYNAKLAR	33
8. ÖZGEÇMİŞ	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil numarası ve başlığı	Sayfa
Şekil 4.1. Generalize tüberküloz olgusundaki peritonda görülen tüberkül lezyonları.	13
Şekil 4.2. Göğüs kafesinin iç yüzeyinde yapışmalar, kostaların üzerinde ve akciğerin kaudo-dorsal lobunda değişik büyüklükte lobüler tarzda tüberkül oluşumları.	14
Şekil 4.3. %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda tesbit edilen mediastinal lenf düğümünün kesit yüzü. Kazeifikasyon ve kalsifikasyon odakları.	14
Şekil 4.4. Sığır akciğer dokusu HE boyama.	15
Şekil 4.5. Sığır karaciğer dokusu HE boyama.	16
Şekil 4.6. Sığır lenf düğümü dokusu HE boyama.	17
Şekil 4.7. Sığır kalp dokusu HE boyama.	18
Şekil 4.8. Sığır akciğer dokusu, <i>M. bovis</i> etkenleri.	19
Şekil 4.9. Sığır akciğer dokusu İHC boyama.	20
Şekil 4.10. Sığır karaciğer dokusu İHC boyama.	21
Şekil 4.11. Sığır lenf düğümü dokusu İHC boyama.	22
Şekil 4.12. Sığır akciğer dokusu İHC boyama.	23
Şekil 4.13. Sığır akciğer dokusu İHC boyama	24
Şekil 4.14. Sığır lenf düğümü dokusu İHC boyama.	25
Şekil 4.15. Sığır akciğer dokusu İHC boyama.	26
Şekil 4.16. Sığır karaciğer ve lenf düğümü dokusu İHC boyama.	27

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

IFN- γ	İnterferon gamma
İHC	İmmunohistokimya
kDa	kilodalton
M. bovis	Mikobakteriyum bovis
M. tuberculosis	Mikobakteriyum tüberkülozis
OIE	Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü
OPN	Osteopontin
SIRT	Sirtuin
%	yüzde
μm	mikrometre
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TB	Tüberkülozis

T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Yüksek Lisans Tezi

**Sığır Tüberkülozunda Osteopontin ve Sirtuin Aktivitesinin
İmmunohistokimyasal Olarak İncelenmesi**

Mustafa SEVTEKİN

Patoloji Anabilim Dalı

Tez danışmanı
Prof. Dr. Özlem ÖZMEN

BURDUR – 2016

ÖZET

Bu çalışmada PPD pozitif olarak zorunlu kesilen sığırlardan makro olarak tüberküloz lezyonu saptanan organların histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak OPN ve SIRT reaksiyonu açısından immunohistokimyasal incelemeleri yapılmıştır. Makro olarak lezyonlara en fazla akciğer ve mediastinal lenf düğümlerinde rastlanmış, ardından karaciğer dalak ve kalpte lokalizasyon saptanmıştır. Lezyonlarda etken varlığı Ziehl-Neelsen metodu ile saptanmıştır. İmmunohistokimyasal incelemede normal dokularda hiç OPN veya SIRT aktivitesi saptanmazken, tüberküloz lezyonlarında belirgin şekilde artış saptanmıştır. Her iki markır için en fazla pozitiflik gösteren hücreler Langhans tipi dev hücreler ile yangısal hücrelerdi. Bu çalışmanın sonuçları OPN ve SIRT aktivitesinin tüberkülün patojenezinde önemli olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: İmmunohistokimya, Osteopontin, Patoloji, Sığır tüberkülozu, Sirtuin

Mehmet Akif Ersoy University
Institute of Health Science

Master of Science thesis

**Immunohistochemical Examination of Osteopontin and Sirtuin Activity in
Cattle Tuberculosis**

Mustafa SEVTEKİN
Department of Pathology

Supervisor
Prof. Dr. Özlem ÖZMEN

BURDUR – 2016

ABSTRACT

In this study, PPD positive with compulsory slaughtered cattle's macroscopically tuberculosis lesioned organs were examined by histopathological and immunohistochemical methods for OPN and SIRT expressions. The macroscopical lesions were commonly localised on lungs and mediastinal lymph nodes, than liver, spleen and heart affected respectively. Agents were detected in the lesions by Ziehl-Neelsen method. At the immunohistochemical examination, no OPN and SIRT expressions were observed in normal tissues while marked increase in expression of these markers in tuberculous lesions. The most marked immunopositive cells were Langhans giant cells and inflammatory cells. This study results indicated that OPN and SIRT has a role in tubercule pathogenesis.

Key words: Bovine tuberculosis, Immunohistochemistry, Osteopontin, Pathology, Sirtuin

1. GİRİŞ

Tüberküloz hayvanlar ve insanlar için bilinen en eski hastalıklardandır. Gerek hayvan sağlığını gerekse insan sağlığını olumsuz yönde etkileyen başta akciğer olmak üzere değişik organ ve dokularda kazeöz nekroz ve kireçlenmeyle karakterize tüberküllerin oluşumuyla tanınan bakteriyel bir hastalıktır. Kronik ve bulaşıcı özelliğe sahiptir. Dünyanın hemen hemen her yerinde evcil ve yabani hayvanlar arasında görülür. Hayvanlardan insanlara geçebilen önemli zoonoz bir hastalıktır (24).

Osteopontin, kollajen olmayan, ekstrasellüler matrikste bulunan, kemik, kalsifiye olmuş kıkırdak ve diş gibi dokulara özgü hücrelerden salgılanan bir sialoproteindir. Osteopontin patolojik olarak mineralize olmuş dokuda ve generalize nekrotik hasar almış yumuşak dokudaki lezyon bölgesinde makrofajlarca üretilir (44).

Osteopontin başlıca kemikte gözlemlenmesine ve osteoblast ile osteoklastlar tarafından sentezlenmesine karşın makrofaj, endotelial hücreler, düz kas hücreleri, aktif T lenfositler, doğal öldürücü hücreler, epitel ve tümör hücreleri tarafından da salgılanır (43).

Başlangıçta mayada keşfedilen sirtuinlerin, protein deasetilaz ve adenozin difosfat (ADP)- ribozil transferaz faaliyeti içerisindeki protein ailelerinden olduğu anlaşılmıştır (9). İlk sirtuin geni Klar ve ark. tarafından *Saccharomyces cerevisiae* mayasında bulunmuştur (35). Sirtuin ailesi genleri bakteriler, solucanlar, sinekler ve memelilerde gözlemlenmiştir (46).

Bu çalışmada tüberkülozlu sığırlardan alınan dokuların histopatolojik yöntemlerle incelenmesi ile osteopontin ve sirtuin aktivitelerinin immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesi ve hastalığın patogenezi hakkında bilgiler elde edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sığır Tüberkülozu Etkeninin Etiyolojisi

Mycobacterium'lar Prokaryotes aleminde, Fimircutes divizyonunda, Actinomycetales takımında, Mycobacteriaceae familyasında ve Mycobacteria cinsinde sınıflandırılmıştır (8).

Mycobacterim tuberculosis (*M. tuberculosis*) kompleks (MTBC) bakteriyolojik özellikleri ve DNA benzerliklerine göre birbirleriyle yakın ilişkili *Mycobacterium* türlerinin bir grubuna verilen isimdir (28).

Bu kompleks *M.tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. bovis* BCG (7), *M. canetti* (74) ve *M.caprae* (3)'ü içerir. Bunların tümü insan ve diğer memelileri etkileyen kronik granümatöz bir hastalık olan tüberküloz'a (TB) sebep olur.

Sığır TB'ü etkeni olan *M. bovis* aside dirençli, aerobik, sporsuz, hareketsiz ve kapsülsüz bir bakteridir (27).

2.2. Sığır Tüberkülozunun Epidemiyolojisi

M. bovis'in konakçı sayısı oldukça fazla olup bunlar arasında sığır, deve, koyun, keçi, kedi, köpek, lama, fil, gergedan, domuz, bizon, bufalo, geyik, tilki, porsuk, insan olmayan primatlar ve insanlar bulunmaktadır. Ancak etken genellikle sığır, geyik, domuz ve insanlarda hastalık oluşturmaktadır (14).

M. bovis'in bulaşma şekli genellikle solunum ve sindirim yoluyla olmakla birlikte, nadiren de olsa deri, konjenital ve genital yollarla da bulaşma olabilmektedir (27). Enfeksiyonun oluşumunda konakçının yaşı, davranışı, çevre, iklim ve çiftlik uygulamalarının rolü vardır. *M. bovis*'in en önemli bulaşma yolu aerosoldür (62). Kalabalık ve havalandırması bozuk ahırlarda bulunan enfekte hayvanlar öksürük ve tıksırık yolu ile hastalığın yayılmasına yol açarlar. Aerosol yolla olan bulaşmalarda, damlacık veya etken taşıyan toz partiküllerinin solunum yoluyla alınmasıyla alt ve üst solunum yollarında enfeksiyona neden olduğu belirtilmiştir (5,14). Enfekte sütün emilmesi, kontamine mera veya sudan direkt olarak *M. bovis*' in alınmasıyla sindirim yolu ile de bulaşma olmaktadır (45). Etkenin hastalık yapabilmesi için sindirim

yoluyla alınan tüberküloz etkenlerinin sayısının solunum yoluyla alınan tüberküloz etkenlerinin sayısından fazla olması gerektiği bildirilmektedir (14).

Eğer üreme organları enfekte olursa genital bulaşma meydana gelebilir, fakat bu tür bulaşma nadirdir (49).

Deri yolu ile bulaşmada oldukça seyrek gözlenir. Süt, idrar ve dışkı ile *M. bovis*'in saçılması, gelişmiş ülkelerde sığır TB'unun nispeten önemsiz bir bulaşma şekli olarak kabul edilir. Bununla birlikte, *M. bovis*' in nazal mukustan izole edildiği bildirilmiştir (13,50).

Konjenital tüberküloziste enfeksiyon umbilikal vena ile fötusa geçer. Buzağuların konjenital enfeksiyonunda primer kompleks karaciğer ve portal lenf düğümlerindedir, ancak başka yerde kompleks tam olmayabilir ve lezyonlar sadece lenf düğümlerinde bulunur. Böylece *tam olmayan primer kompleks* şekillenir. Bir fötusta veya birkaç günlük buzağıda portal lenf düğümünde rastlanan tüberküloz lezyonu konjenital enfeksiyona yorumlanabilir (27).

M. bovis insanlara sindirim, aerosol inhalasyon veya mukoz membranlar ve deri sıyrıklarından direkt temas ile bulaşabilir (4,21). İnsanlara asıl bulaşma şeklinin aerosol inhalasyon ve pastörize edilmemiş süt ürünlerinin tüketimiyle olduğuna inanılır (73).

Türkiye'de sığır tüberkülozu ile ilgili çalışmalar 1900'lü yılların başında başlamıştır. Ancak hastalığın insidensi hakkında sağlıklı bir veri bulunmamaktadır (34,54,72). Kayseri bölgesinde sığır tüberkülozunun prevalansı %1.49 olarak saptanmış ve BACTEC radyometrik metodun, *M. bovis*' i saptamada hızlı ve duyarlı bir tanı yöntemi olduğu bildirilmiştir (23). Van bölgesindeki hayvanlardan alınan burun akıntısı ve süt örneklerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile incelenmesi sonucu, burun akıntısı örneklerinin 3 tanesinde, süt örneklerinin ise 1 tanesinde pozitiflik bulunmuştur (72). Dünya hayvan sağlığı örgütü (OIE) verilerine göre Türkiye TB hastalığının görüldüğü ülkeler arasında yer almaktadır (2,57).

2.3. Sığır Tüberkülozunun Patogenezi

Duyarlı konakçının vücuduna giren virulent etkenler girdikleri dokuda yerleşerek yabancı bir cisim gibi etki yapar ve üremeye başlar. Burada etkeni ilk olarak polimorf lökositler karşılar ve onları fagosite eder ve sonuçta bölgede değişik oranda bir lökosit infiltrasyonu şekillenir. Bu hücreler tüberküloz etkenlerini tam olarak yok edemez, hatta etkenlerden salgılanan bazı maddelere bağlı olarak bu lökositler ölmeye başlar ve etkenler tekrar serbest hale gelir. Bu süre ortalama 24-48 saattir. Bu arada bölgeye kan ile monositik makrofajlar ve histiyositik hücreler gelir, bunlar etkenleri fagosite eder, mikroorganizmalardan açığa çıkan lipoid vb. maddelere bağlı olarak makrofajlar şekil değiştirir ve epiteloid tipte makrofajları oluşturur, bunlarda kendi aralarında birleşerek Langhans tipi dev hücreleri meydana getirirler. Bu lezyon tüberkülozun vücutta oluşturduğu ilk lezyondur ve çoğunlukla gözle görülecek kadar büyük olmaz. Bu lezyonlar ortalama 10 gün içinde oluşur. Bu ilk lezyonun çevresinde zamanla ikinci, üçüncü lezyonlar gelişir ve lezyonların orta kısımları zamanla kazeifikasyon nekrozuna uğrar ve kireçlenir. Bu ilk lezyondaki etkenler, serbest veya makrofajlar içinde, lenf damarları vasıtasıyla bölgesel lenf düğümlerine oradanda genel kan dolaşımına karışarak, yayılır, yani generalize olur. Hayvanlarda etkenler, çoğunlukla akciğer, meme, uterus, pleura gibi organlara giderler ve oralarda da mikropları retikuloendotelial sistem (RES) hücreleri karşılar ve benzer tip lezyonlar oluşturur. Tüberküloz etkenin girdiği organda oluşturduğu ilk lezyona *primer effekt* adı verilir. Etkenler aynı organın lenf düğümlerinde de lezyon oluşturabilirler bu durumda da iki lezyona birden *primer kompleks* adı verilir. Her organda etkenin ilk girdiği organda primer effekt şekillenirken her zaman primer kompleks durumu oluşmayabilir. Konakçının vücut direncinin yüksek olduğu durumlarda, organdaki primer effekt kapsüllenebilir veya fazla gelişmez. Ancak yayılım şekillenmese bile lezyonda, mutlaka canlı etkenler bulunur. Bu lezyonlar röntgenlerde görülmez sadece tüberkülin testi ile pozitiflik sağlanır. Bu tür vakalarda hayvan yaşamına sorunsuz devam ederken, yaşam konforunda meydana gelen değişim durumlarında, aşırı strese bağlı olarak lezyonlardaki etkenler tekrar aktif olurlar ve kan ile yayılırlar. Buna *reenfeksiyon* denilmektedir (24).

2.4. Sığır Tüberkülozunun Histopatolojisi

Etkenle karşılaşmadan sonraki 10 gün ya da daha uzun sürede aşırı duyarlılık şekillendiğinde lezyon bölgesinde birçok basil bulunur ve olayların hızı artmaya başlar. Duyarlı kılınmış T lenfositlerinden salınan sitokinler çoğunlukla kan monositlerinden gelişen makrofajların olgunlaşmasına, proliferasyonuna ve aktivasyonuna neden olur. Makrofajlar enfekte odaklarda epitel hücre dizilerine benzerliklerinden dolayı epitelioid hücreler olarak nitelendirilen karakteristik bir görünüm alır. Epitelioid hücreler büyük veziküler çekirdekli, belirsiz sınırlı, büyük soluk sitoplazmalı hücrelerdir. Sitoplazmalarında sindirilmiş basiller bulunur ve hücredeki yapısal değişiklikler artmış bakterisidal aktiviteyi gösterir. Epitelioid hücrelerle beraber değişen sayıda Langhans tipi dev hücreleri görülür. Langhans tipi dev hücreler değişik sayıda eksantrik çekirdekli büyük hücreler olup makrofajların kaynaşmasıyla şekillenmişlerdir (26).

Yeni oluşmuş tüberküllerin merkezinde epitelioid ve dev hücre oluşumlarının karışımı dikkati çeker. Çevrelerinde dar bir şerit tarzında lenfosit, plazma hücreleri ve yıkılmamış monositler bulunur. Lezyon ilerledikçe periferinde fibroblastların şekillendiği tüberkülün orta kısmı nekroza uğrar. Bu iki özellik bütün tüberküloz enfeksiyonlarda bulunmaz. Hem tür hem de bireysel farklılıklar gözlenebilir. Özellikle tüberkülozise karşı direnç gösteren hayvanlarda kapsüllenmiş fibroplazi dikkati çeker ve bu hayvanlarda fibroblastik üreme bütün lezyonu tutar (26).

Santral nekrozun gelişimi tüberküle belirgin bir histolojik özellik kazandırır. Nekroz hücresel aşırıduyarlılığın bir ürünüdür ve kazeöz karakterdedir. Nekrotik materyal çoğunlukla sarımtırak peynirimsi bir kitle şeklinde kıvamlı hale gelir ve likefiye yada kalsifiye olabilir. Kalsifikasyon bazı hayvan türlerinde karakteristik bir gelişmedir ancak bazen diğer türlerde de görülebilir (26).

2.5. Sığır Tüberkülozunun Teşhis Yöntemleri

Sığır tüberkülozunun antemortem teşhisinde en sık PPD (Purified Protein Derivate) tüberkülün deri testi uygulanır. Çok tercih edilmeyen diğer bir teşhis yöntemi ise gamma interferon testi (IFN- γ) dir. Sığır tüberkülozunun postmortem teşhisinde ise histopatolojik muayene, kültür, moleküler metodlar ve bakteriyoskopi yöntemleri kullanılır (53). Sığır tüberkülozunun antemortem teşhisinde en yaygın

kullanılan PPD tüberkülin, *M. bovis* AN5 suşundan üretilmektedir. Tüberkülin testi dünyada genel olarak boynun yan orta kısmından deri içine enjeksiyon şeklinde uygulanır (67). Tüberkülin testi ya Bovine PPD yada hem Bovine hemde Avian PPD'nin karışımı şeklinde uygulanabilmektedir (15). PPD tüberkülin testi uygulandıktan 72 saat sonra ölçüm yapılmalıdır. Deride yangısal belirtiler olarak şişlik, kızarıklık ve ağrı görülebilmektedir. Testin reaksiyon oluşturması için T hücrelerinin PPD tüberkülin enjeksiyonundan en az 6 hafta önce duyarlı hale gelmiş olması gerekmektedir. Ölçümde pozitif sonuç vermesi canlının daha önceden tüberküloz basili ile duyarlı olduğunun göstergesidir (61,63,67).

2.6. Osteopontin

Osteopontin (OPN) birçok patolojik ve fizyolojik olayda sekrete edilen bir proteindir. Hem sitoplazma hem de çekirdekte bulunduğu saptanmıştır (31).

Osteopontin sadece kemik mineralizasyonunda değil ektojik ve patolojik kalsifikasyonlarda da artış gösterir (31).

Sekrete glikoprotein OPN, kemik remodülasyonu ile apoptozisin inhibisyonunun immunomodülasyonuna kadar birçok aktiviteyi harekete geçirmektedir.(11)

Bu çok yüzlü glikoprotein birçok değişik hücre ve doku tarafından eksprese edilir (18,25) ve birçok fonksiyonu yerine getirmesi beklenir. Bu nedenle OPN'nin yeni keşfedilen çok sayıdaki fonksiyonu sürpriz değildir, bu proteinin ilk olarak kemiklerde keşfinden sonra yapılan çalışmalarla çok sayıda etkisi saptanmıştır. OPN, hücre-matriks ve matriks-matriks yüzlerinde lokalize olan non kollagen proteinlerin en bol bulunanlarındandır. Birçok çalışma OPN'nin en önemli fizyolojik fonksiyonunun biomineralizasyonun kontrolü olduğunu göstermiştir (25).

OPN ilk olarak kemikten izole edilmiş ve daha sonra bağımsız olarak sekrete fosfoprotein I (SppI) ve erken T-lenfosit aktivasyon 1 (Eta-1) olarak tanımlanmıştır (59).

OPN yaklaşık 32 kDa bir protein olarak sentezlenir, fakat geniş posttranslasyonel modifikasyonlar sebebiyle moleküler kütlesi 45-75 kDa arasında değişir (33). OPN asidik aminoasitler nedeniyle negatif yüklüdür. OPN kalsiyum bağlama bölgeleri ve iki heparin bağlayıcı alan içerir (37).

2.6.1. Osteopontinin Yangıdaki Rolü

Birçok çalışma osteopontinin makrofajlar gibi yangısal hücrelerde ekspresyonunun gözlendiğini ve yangısal aktivite anında indüklendiğini göstermiştir (31).

Osteopontinin yapıcı şekilde tanımlanmış bir proteindir ve bütün hücrelerde büyüme faktörleri ve sitokinlerin hücrel aktivasyonunu takiben hızla artış gösterdiği incelenmiştir. Yangı sırasında makrofajlarda osteopontin salınımını düzenleyen moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılammıştır. Osteopontinin monositin kemotaksisi, göçü, farklılaşması ve fagositozu dahil hücrel bağışıklık fonksiyonlarını kontrol ettiği kabul edilmektedir. Osteopontin, monosit ve makrofaj kemotaksisi ve hücrel motilite geçişlerini birçok hücre yüzeyi reseptörleri ile doğrudan etkileşim yoluyla gerçekleştirir (31).

OPN, T helper hücrelerinin Th1 veya Th2 fenotiplerine dönüşmesine, Th1 sitokinlerinin gelişmesine ve Th2 sitokinlerinin inhibe olmasına sebep olur (31).

OPN'nin makrofaj, aktive T hücreler, dendritik hücreler, doğal öldürücü T hücreler ve plateletlerin de dahil olduğu bir çok immun hücre tarafından salgılandığı bildirilmiştir (25). Hücre zedelenmesi veya enfeksiyonda, interlökin 1 (IL-1), tümer nekroz faktör alfa (TNF- α) ve platelet derivated growth factor (PDGF) gibi çeşitli proinflatuar mediatörler ve büyüme faktörlerinin uyarımıyla OPN ekspresyonunda artış şekillenir (18). Daha sonra OPN dokular arasında birçok olayı gerçekleştirir, sıklıkla monosit toplanması, makrofaj diferensiyasyonu ve fagositozis, Th1 sitokin cevaplarının erken uyarılması gibi olayları başlatır, NO üretiminin, MMP-2 ekspresyonunun, Th2 sitokin üretiminin sınırlanması ve apoptozisin baskılanması gibi bazı olayları aktive ederken bazılarını inhibe eder (32). OPN'nin yönettiği olaylar sadece kemik ile ilgili değil aynı zamanda endotel ve epitel dokulardaki (örn. yaralanma veya enfeksiyon sonrası), anti-enfeksiyon savunma, yara iyileşmesi ve sınırlı yangı ve enfeksiyon oluştururken doku zedelenmesi (18,70) olaylar ile ilgili olduğunu göstermektedir.

OPN bir matriselüler proteindir, değişik biyolojik fonksiyonları ayarlar. Bu protein normal fizyolojik olaylarda ve aterosklerozis, glomerulonefritis, kanser ve çeşitli kronik yangısal hastalıklar gibi birçok hastalığın patogenezinde rol alır. Çeşitli integrinler ile reaksiyona girerek, OPN hücre migrasyonunu, adezyonunu ve birçok

hücre tipinde yaşam süresini ayarlar. OPN aynı zamanda Th1 sitokin gibi fonksiyon yapar, hücre aracılı immun cevapları destekler, kronik inflamatuvar ve otoimmün hastalıklarda rol oynar. Yangıdaki fonksiyonu yanı sıra OPN biomineralizasyonun ayarlayıcısıdır ve vasküler kalsifikasyonun güçlü bir inhibitörüdür (41).

OPN, kemik, böbrek, iç kulak, uterus, plasenta, arteriyel düz kas hücreleri ve insan sütü gibi birçok doku ve vücut sıvısında bulunur. İdrarda bulunan OPN üropontin olarak isimlendirilir ve kalsiyum oksalat kristallerinin üretimini inhibe ederek idrar taşı oluşumunu engeller. Normal dokudaki sınırlı dağılımına karşın, yangı ve doku onarımında salınımı artar. Çok sayıda yangısal ve immun olayın patogenezinin karışır (10,41).

2.7. Sirtuin

Sirtuin (SIRT); nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) bağımlı sınıf 3 histon deasetilaz bir proteindir (52). Günümüzde 7 adet sirtuin proteini ortaya çıkarılmıştır (52). Bunlar NAD⁺ bağımlı deasetilaz (DAC) olarak ve/veya mono-ADP- ribosil transferaz (ART) şeklinde hareket edebilen, NAD⁺ bağımlı katalitik temel alanına sahiptirler (6). Sirtuinler ilk olarak mayada histon yada histon dışı hedeflerin deasetilasyonu ile gen düzenleyicisi olarak tanımlanmışlardır. Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) kofaktörüne ihtiyaç duyan Sirtuinler, Histon deasetilaz (HDAC) tip III histon deasetilazların içinde sınıflandırılırlar. Bilinen HDAC'lara benzemezler, ancak histonlar gibi metabolik enzimlerden yapısal proteinlere kadar değişik substratlara sahiptirler (22). Bu proteine Sirtuin ismi 1999 yılında beş adet SIRT-2 insan homologunu tanımlayan Roy Frye tarafından verilmiştir (20). SIRT-1'in hücre ölümü yada yaşamasında ve hücrenin stres cevabında önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir.

SIRT-1 apoptozisi baskılayarak hücre yaşlanmasını engellerken DNA hasarı ve oksidatif stres durumunda hücre yaşlanmasını uyarmaktadır (68).

Sirtuinlerin hücreler arasındaki yerleşim yerlerinde farklar vardır. SIRT-1, SIRT-6 ve SIRT-7 genellikle çekirdektedir. SIRT-1'in çoğunluğu çekirdekte ökromatinle kaynaşmış, SIRT-6 ise heterokromatinle kaynaşmıştır. SIRT-7 çekirdekte lokalize olmuştur (47). SIRT-2 sitoplazmada yoğun olarak bulunur. Mitokondriyal olarak tanımlanan sirtuinler, SIRT-3, SIRT-4 ve SIRT-5'tir (51).

Maya, kurt ve meyve sineğinde sirtuin genlerinin yaşam süresini uzattığı, gösterilmişken memelilerde bu konularla ilgili yeterli bir veri bulunmamaktadır (1). Memelilerde yapılan çalışmalarda, SIRT-1'in değişik dokularda diyet değişikliklerine bağlı metabolik yanıtı regüle ettiği gözlenmiştir. Yine SIRT-1'in yaşlanma ile ilgili patofizyolojik değişimleri geciktirdiği, T2DM ve Alzheimer gibi yaşlanma ile ilgili hastalıklardan önlediğine ilişkin bilgilere rastlanmıştır (29). Sirtuinler metabolizmada, kanserde, yaşlanmada ve muhtemelen uzun yaşamada sessiz ve önemli bir düzenleyici olup strese bağlı sinyal yollarında kritik bir bağlantıya sahiptir (49). Çoğu canlı türünde yaşam süresini en tutarlı biçimde uzatan durumun kalori kısıtlaması olduğu düşünülmekte ve bu durumun histon deasetilaz olarak fonksiyon gören SIRT-2 gibi sirtuin ailesinden proteinleri aktifleştiren bir stres düzeyi oluşturduğu öne sürülmektedir (38).

Sirtuinler çeşitli transkripsiyon faktörlerinin ve enzimlerin deasetilasyonu ile birkaç hücrel mekanizmayı düzenler. Son zamanlarda, SIRT-2 ateşli süreçlerin gelişimini önlemek için gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada in vivo olarak SIRT-2 aktivitesinin modülasyonunun *Mycobacterium tuberculosis* ile kronik enfeksiyonu etkilemesinin beklenmediği ortaya konmuştur (12).

Bu çalışmanın amacı, birçok yangısal olayda etkili olduğu bildirilen OPN ve SIRT aktivitesinin doğal şekillenmiş sığır tüberkülozunda immunohistokimyasal olarak belirlenmesidir. Bu amaçla mezbahada kesilen ve PPD pozitif sığırlardaki makro lezyon bulunan dokulardan toplanan örnekler histopatolojik, mikobakterilerin tespiti için Ziehl-Neelsen ve OPN ile SIRT için immunohistokimyasal olarak incelenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması

Çalışmamızda Afyonkarahisar yöresinde 2014 yılında mezbahada şartlı kesime tabi tutulan PPD pozitif 25 büyükbaş hayvandan postmortem muayenede makroskobik olarak tüberküloz lezyonu görülen ve rastgele seçilen akciğer, karaciğer, kalp ve lenf nodüllerinden lezyonlu bölgeler ve lezyonun sağlam dokuyla birleştiği alandan örnekler alındı. Alınan doku örnekler içinde %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonu ve her bir hayvana ait kodların bulunduğu cam kavanozlara konuldu. Doku örneği alınan hayvanların yaşları 4 aylıkla 12 yaş arasında değişmekteydi. Ayrıca kontrol olarak hiçbir organda makro lezyon gözlenmeyen 5 sığırın organları toplandı.

3.2. Laboratuvar Çalışmaları

%10'luk tamponlu formaldehit solüsyonunda tespit edilen lezyonlu ve kontrol doku örnekleri Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalına getirildi. Alınan örneklerden trimlenen doku parçaları örnek doku kodu yazılı olan takip kasetlerine alındı. Akarsu altında 1 saat yıkanan kasetler doku takip cihazına takıldı ve gerekli ayarlamalar yapılarak dokuların gece boyunca düşük dereceli alkollerden yüksek dereceli alkollere (%70'den %100'e) geçirilerek yumuşak dokuda bulunan sularının alınması, iki adet ksilolden geçirilerek organlardaki yağın alınması ve sıcak parafine geçirilerek doku boşluklarına parafin dolması sağlandı. Ertesi gün sabah dokular parafine gömülerek blokajları yapıldı. Bloklardan 4-5 saat soğutulmanın ardından Leica 2155 rotary mikrotomda, 5 mikron kalınlığında seri kesitler alındı. Normal lama alınan kesitlerin bir takımı hematoksilin eozin ile bir takımı Ziehl Neelsen yöntemi ile boyandı. OPN ve SIRT aktivitesi için polilizinli lamlara iki takım kesit alındı.

3.2.1. Histopatolojik Yöntem

Normal lamlara çekilen 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

3 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. Tüm işlemler kontrol organlarının kesitleri içinde uygulandı.

3.2.2.Ziehl-Neelsen Yöntemi

Normal lamlara çekilen kesitlerin diğer takımı deparafinize ve rehidrete edildikten sonra etüvde 60°C'de 1 saat karbol fuksin solusyonu ile boyandı. Ardından asit alkolde dekolore edilen kesitler metilen blue ile zemin boyamasına tabi tutuldu. Dereceli alkol serisinden geçirilen ve ksilolde parlatılan kesitlere entellanl damlatılarak üzerine lamel kapatıldı. Kontrol organlarının kesitleri de aynı şekilde boyama işlemine tabi tutuldu.

3.2.3. İmmunohistokimya

Polilizinli lamlara çekilerek hazırlanan 2 ayrı seri kesit immunoperoksidaz yöntem için streptoavidin-biotin kompleks peroksidaz yöntemine göre boyandı. İmmunohistokimyasal inceleme için Abcam(UK) firmasının hazır kitleri kullanıldı. Kesitler Osteopontin [Anti-Osteopontin antibody (ab8448), Abcam, 1/100 dilüsyon] ve Sirtuin [Anti-SIRT1 antibody [E104] ab32441), Abcam, 1/100 dilüsyon] reaksiyonunun saptanması için immunohistokimyasal olarak boyandı. Bu amaçla kesitler ksilol ve dereceli alkollerden geçirilerek deparafinize ve rehidre edildi. Dokular 10 dakika süreyle suda yıkandı. Daha sonra dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini gidermek amacıyla kesitler %3'lük metanoldeki hidrojen peroksit ile 20 dakika muamele edildi. Dokular 2 defa 10'ar dakika süreyle PBS'de yıkandı. Mikrodalga fırında sitrat buffer solusyonu (pH 6) ile 700'lük ayarda 5 dakika süreyle iki defa kaynatıldı. Dokular 10'ar dakika süreyle 2 defa PBS'te yıkandı. Daha sonra nonspesifik boyamaları önlemek amacıyla normal serumda 45 dakika süreyle tutuldu. Bu aşamadan sonra yıkama yapılmadan primer serumlar uygulandı ve oda sıcaklığında bir gece bekletildi. Ertesi gün dokular aynı şekil ve süreyle PBS'te yıkandı, takiben biotinli serum ile 30 dakika süreyle muamele edildi ve PBS'te 2 defa 10'ar dakika yıkandı. Bu işlemden sonra dokular streptoavidin ile 30 dakika süreyle inkübe edildi. Dokular aynı şekil ve süreyle yıkandı, hazırlanmış olan DAP

(3,3 diaminobenzidine) kromojen ile boyandı. Karşıt boyama için Harris hematoxilen kullanıldı ve preparatlar ışık mikroskopunda incelendi. Kontrol organları da aynı yöntemle göre boyandı.

Sonuçların fotoğraflanmasında Olympus CX41 model mikroskop ile morfolometrik inceleme ve mikrofotografi için Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) kullanıldı.

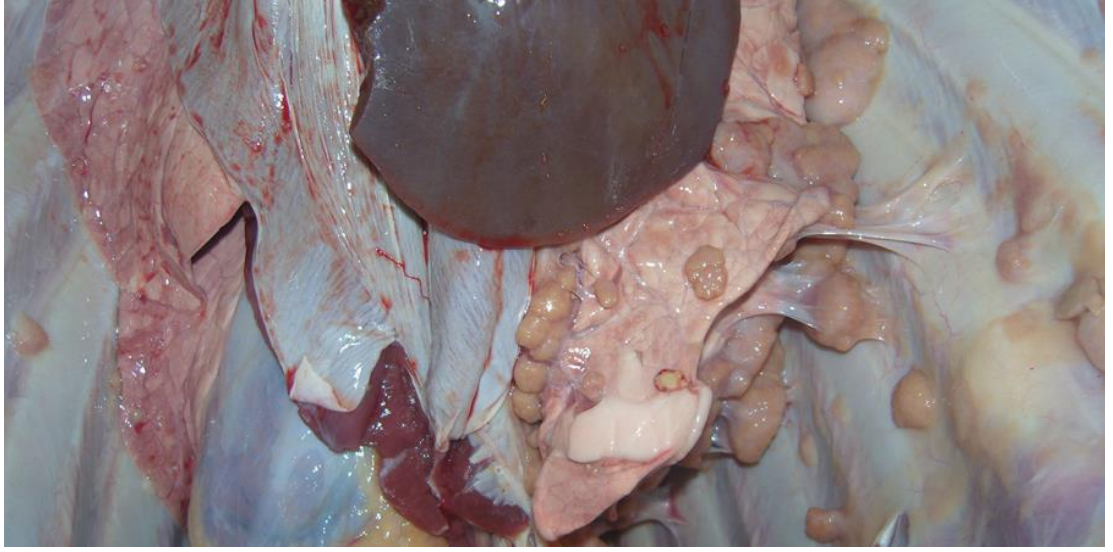
4. BULGULAR

4.1. Makroskopik Bulgular

Kesilen hayvanların postmortem incelemesinde peritonda ve plörada çok sayıda tüberkülün bulunduğu ve birçok olguda akciğerlerin, toraksın iç yüzünde yapıştığı görüldü. Göğüs boşluğunun incelemesinde plörada değişik büyüklükte sarı boz renkte, lobüler tarzda multiple tüberküller gözlemlendi. Mediastinal lenf düğümlerinde belirgin büyüme gözlenmiş olup kesit yüzlerinde kazeifikasyon nekroz odaklarına ve yaygın kalsifikasyonlara rastlandı. PPD pozitif reaksiyon veren 25 büyükbaş hayvanın kesim sonrası makroskopik muayenesinde bütün örneklerde akciğer ve mediastinal lenf düğümünde, bunlarla birlikte 7 olguda karaciğerde ve 1 olguda dalakta tüberkül oluşumları görüldü. Ayrıca altı aylık erkek bir danada kalpte tüberküllere rastlanmıştır (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3)



Şekil 4.1. Sığır, generalize tüberküloz, peritonda görülen diffuz dağılımlı tüberküller (incili tüberküloz).



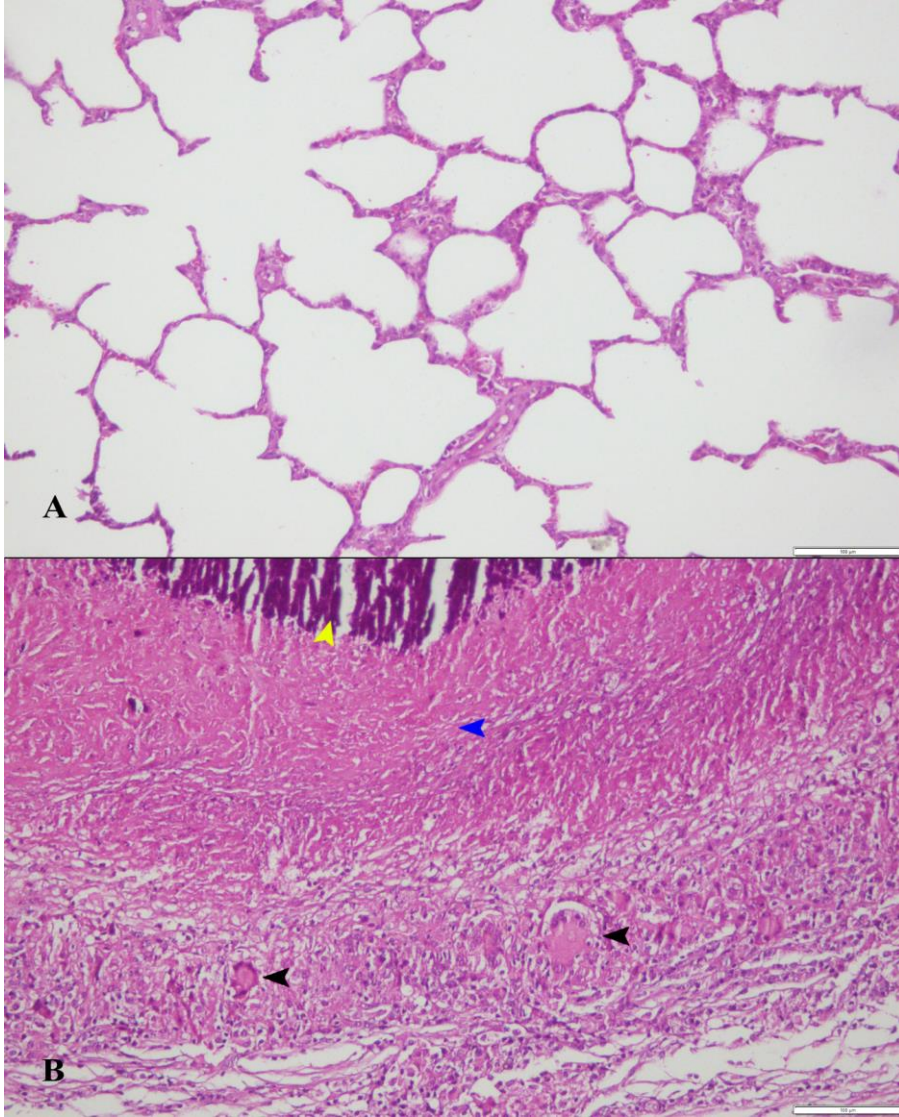
Şekil 4.2. Sığır, göğüs kafesinin iç yüzeyinde yapışmalar, kostaların üzerinde ve akciğerin kaudo-dorsal lobunda değişik büyüklüklerde lobüler tarzda tüberküller.



Şekil 4.3. Sığır, mediastinal lenf düğümü, kesit yüzünde kazeifikasyon nekrozu ve belirgin kalsifikasyon odakları, %10'luk tamponlu formalin tespiti ardından.

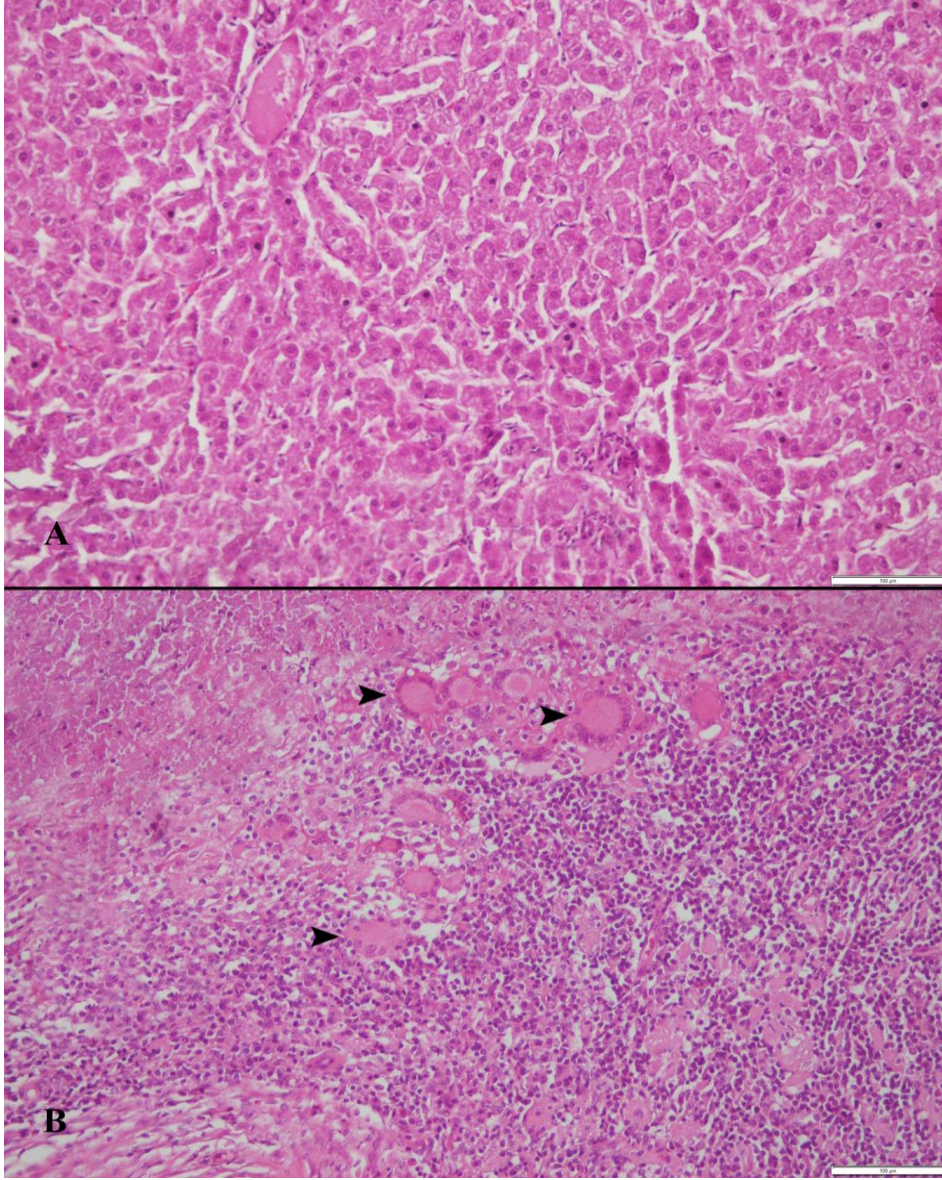
4.2. Mikroskopik Bulgular

Rutin hematoksilen eozin boyamasından sonra yapılan histopatolojik incelemede kontrol grubundaki organlarda herhangi bir lezyon saptanmadı. Tüberküloz lezyonlu akciğerlerde alveolar ve interlobuler alanlar içinde yaygın kazeifikasyon nekroz alanları, bronşiol ve bronş çevresinde yoğun lenfohistoyositik infiltrasyonla birlikte epitelooid hücre ve Langhans tipi dev hücre oluşumları gözlemlendi, ayrıca interlobuler alanlarda bağ doku artışı ve fibröz proliferasyonlar belirlendi (Şekil 4.4)



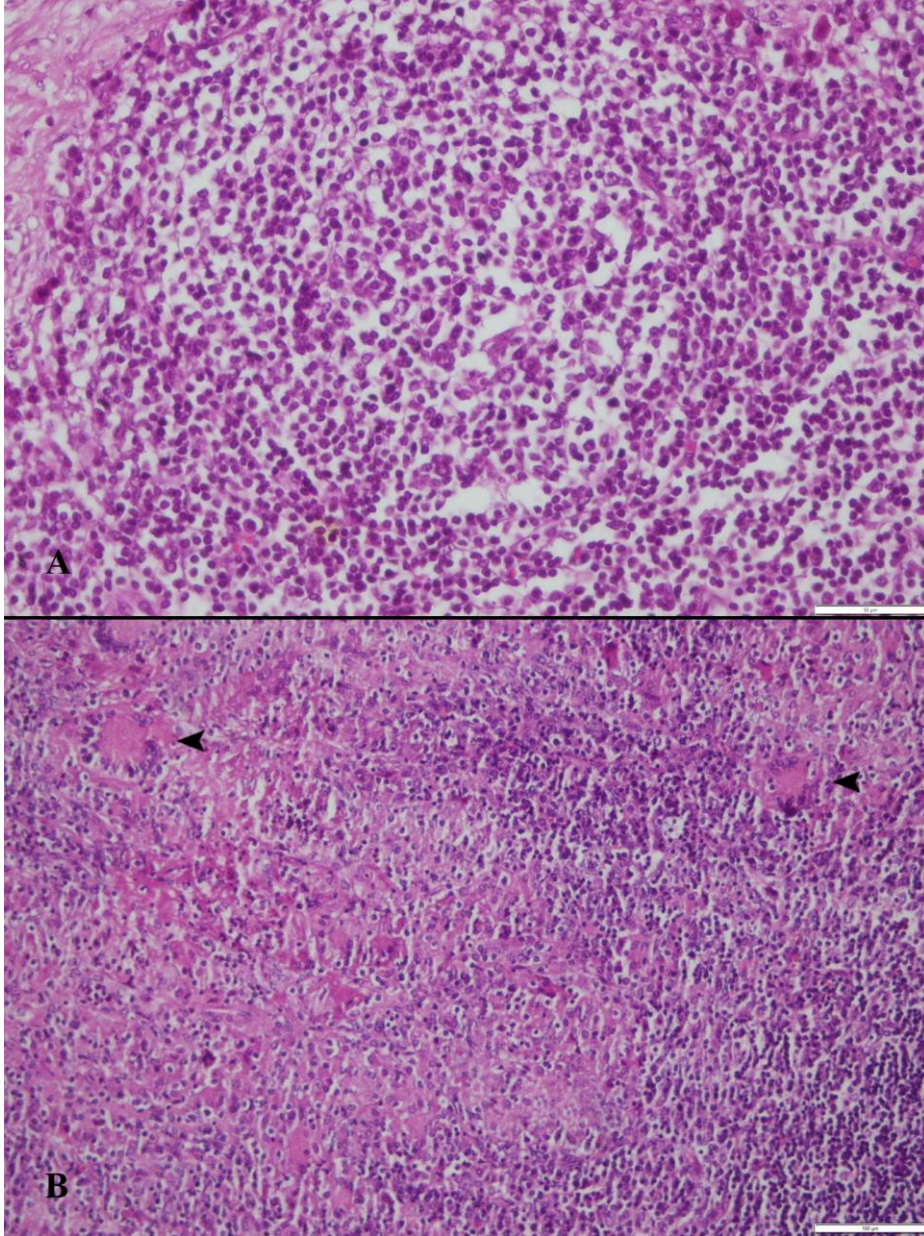
Şekil 4.4. Sığır, akciğer A) Kontrol grubu, akciğerin normal histolojik görünümü, HE, Bar=100 µm. B) Tipik bir tüberkül, kazeifikasyon nekrozu (mavi ok başı), kalsifikasyon (sarı ok başı), Langhans tipi dev hücreler (siyah ok başları), HE, Bar=100 µm.

Hematoksilen-eozin boyamada kontrol grubunun karaciğerleri normal mikroskopik yapıyı gösterirken tüberküloz lezyonu olan sığır karaciğerinde karakteristik tüberkül oluşumu ve çok sayıda Langhans tipi dev hücreler gözlemlendi. (Şekil 4.5. A-B).



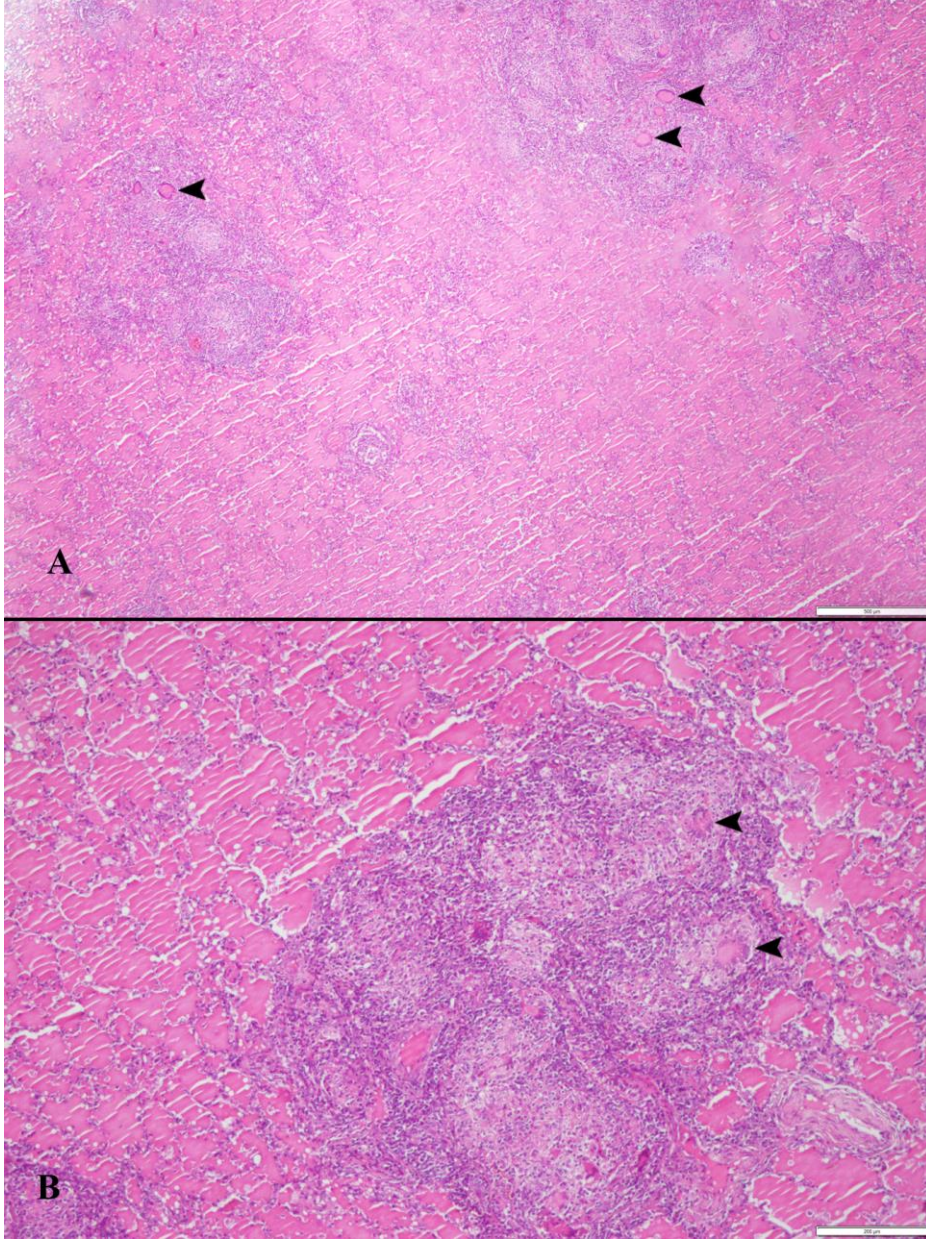
Şekil 4.5. Sığır, karaciğer **A)** Kontrol grubu, Normal karaciğer histolojisi, **B)** Tüberkülozlu karaciğerde karakteristik tüberkül yapısı ve tipik Langhans tipi dev hücreler (ok başları) HE, Bar=100 µm.

Kontrol lenf düğümleri tipik histolojik görünümüne sahip iken, tüberkülozlu hayvanların tümünde lenf düğümlerinde tipik lezyonlar saptandı (Şekil 4.6. B).



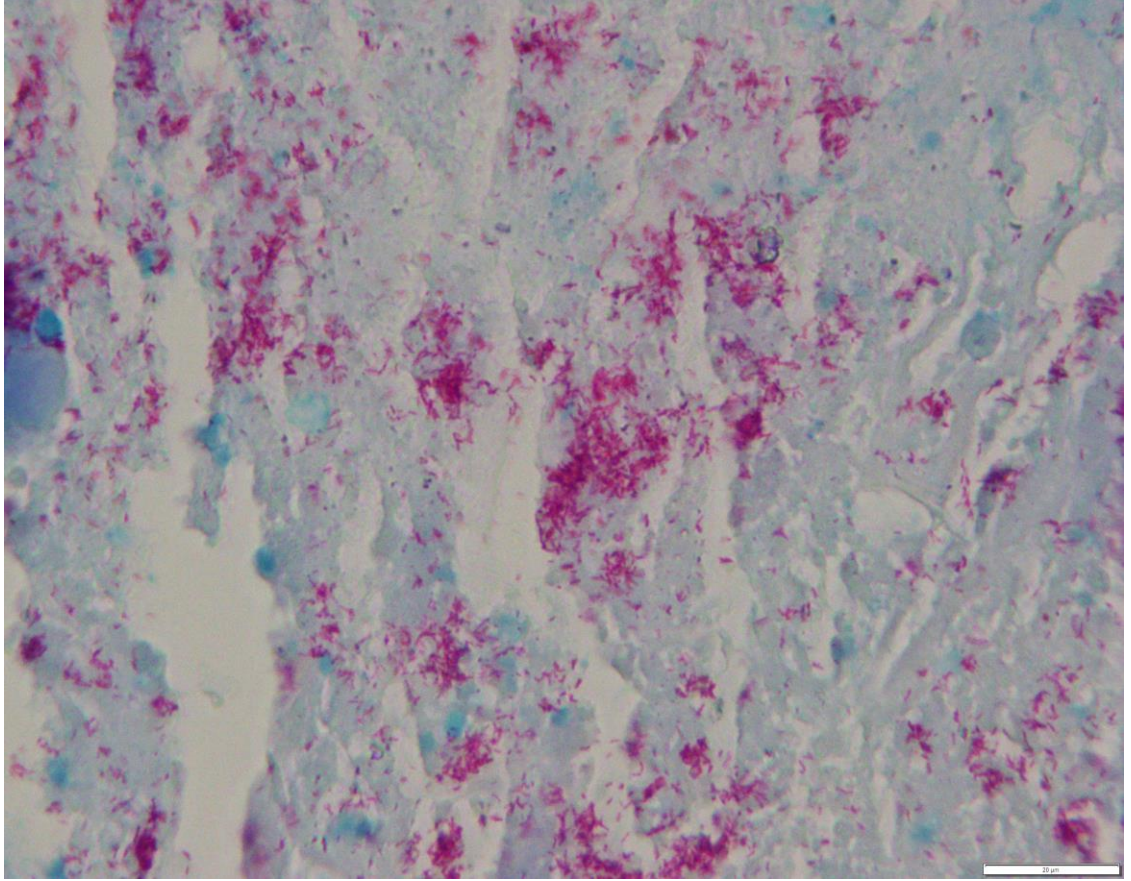
Şekil 4.6. Sığır, mediatinel lenf düğümü **A)** Kontrol grubu, normal histolojik görünüm, HE, Bar=50 µm **B)** Tipik tüberküloz lezyonu ve karakteristik Langhans tipi dev hücreler (ok başları), HE, Bar=100 µm.

Çalışmamızda incelediğimiz bütün hayvanların lenf düğümü ve akciğerlerinde lezyon saptanırken, 6 aylık bir danada kalp dokusunda tüberküloz lezyonları gözlemlendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Sığır, kalp kası, Tüberküloz **A)** Kas demetleri arasındaki tüberküllerin görünümü, karakteristik Langhans tipi dev hücreler (ok başları), HE, Bar=500 µm. **B)** Lezyonun yakından görünümü, Langhans tipi dev hücreler (ok başları), HE, Bar=200 µm.

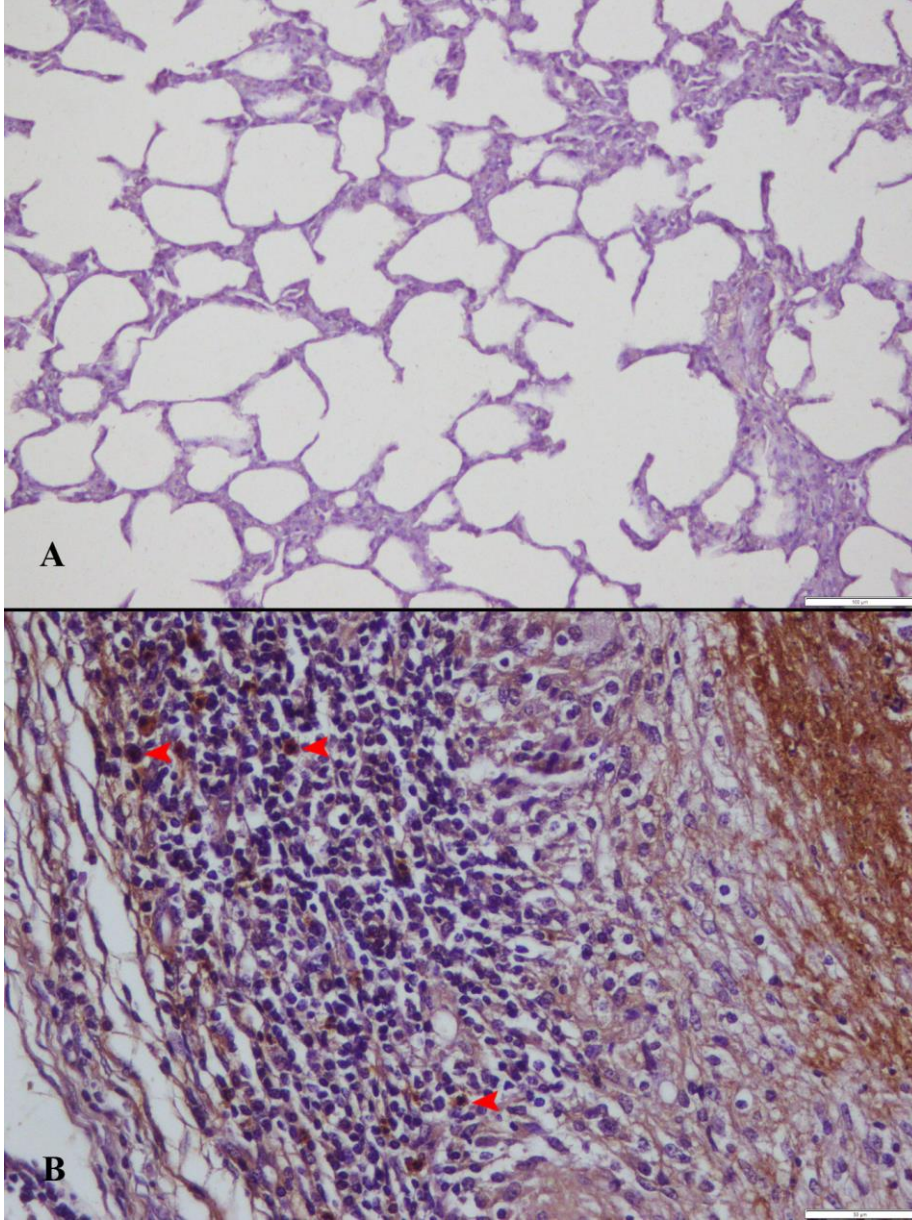
Tüberküloz lezyonlarında *Mycobacteria*'ların tespiti için yapılan Ziehl-Neelsen boyamasında mavi zemin üzerinde kırmızı basiller şeklinde etkenler gözlemlendi (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. Sığır, akciğer, Tüberküloz, *M.bovis* etkenleri (kırmızı renkli basiller), ZN, Bar=20 µm

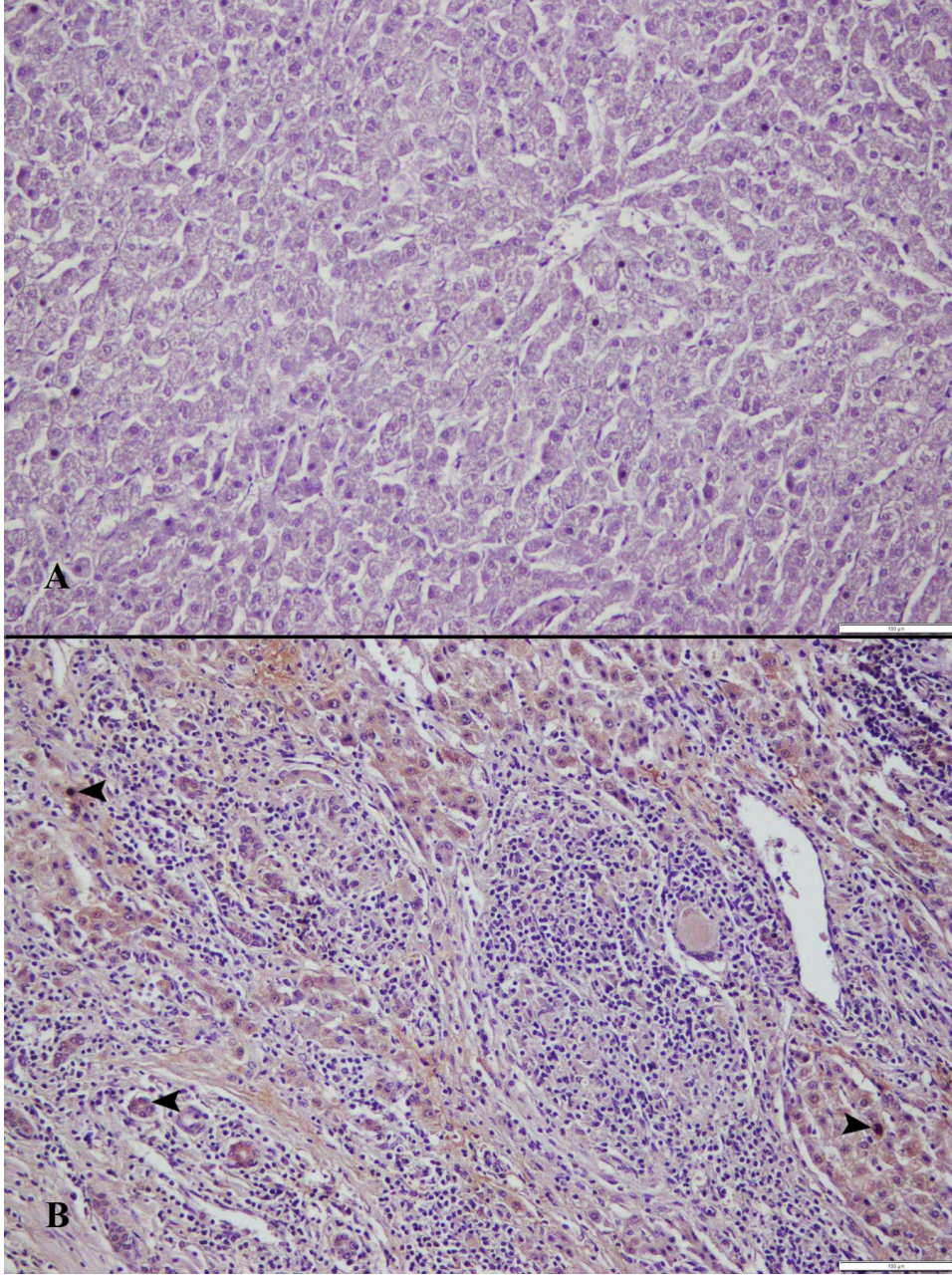
Çalışmamızda makroskobik olarak lezyon tespit edilen bütün organlarda mikroskopik incelemede de karakteristik tüberküloz lezyonları saptandı. Lezyonlarda karakteristik olarak kazeifikasyon nekrozu, kalsifikasyon ve Langhans tipi dev hücrelere tüm olgularda rastlandı. Ziehl-Neelsen yöntemiyle basiller tespit edildi.

Tüberkülozlu akciğer dokularında immunohistokimyasal boyamada kontrol grubuna kıyasla OPN immunoreaksiyonun belirgin şekilde arttığı saptandı. OPN'nin en yoğun olarak Langhans tipi dev hücrelerinde reaksiyon verdiği saptandı (Şekil 4.9.).



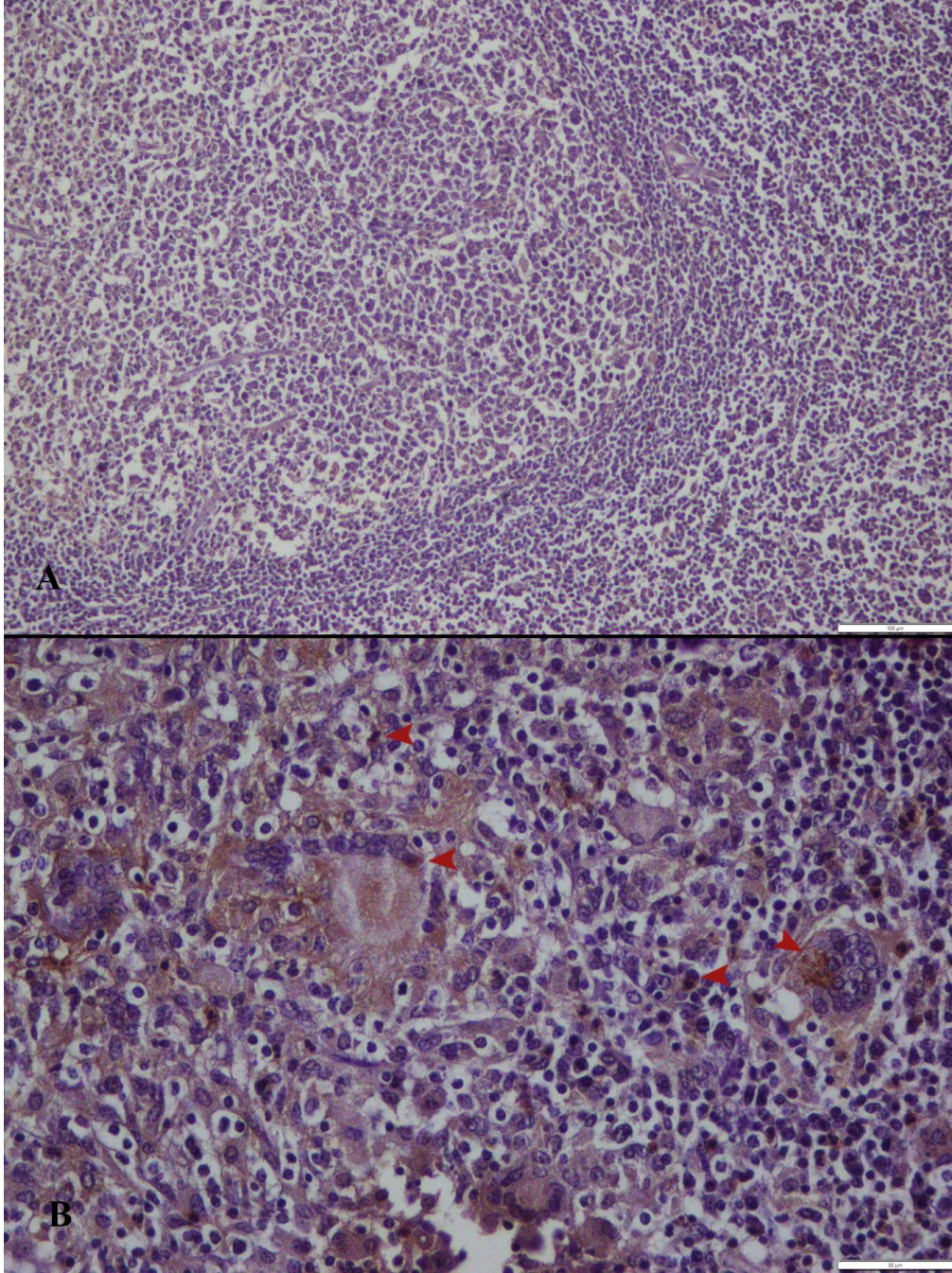
Şekil 4.9. Sığır, akciğer **A)** Kontrol grubu OPN negatif immunoreaksiyon, streptavidin biotin peroksidaz, Bar=100 µm. **B)**Tüberküloz lezyonunda OPN pozitif immunoreaksiyon veren yangısal hücreler, (kırmızı ok başları), streptavidin biotin preoksidaz, Bar=50 µm.

Tüberkülozlu sığır karaciğer dokusunun immunohistokimyasal boyamada kontrol grubuna kıyasla OPN ile artmış immunoreaksiyon verdiği görüldü. OPN'nin özellikle Langhans tipi dev hücrelerde, hepatositlerde ve yangısal hücrelerde pozitif immunoreaksiyon verdiği saptandı (Şekil 4.10.).



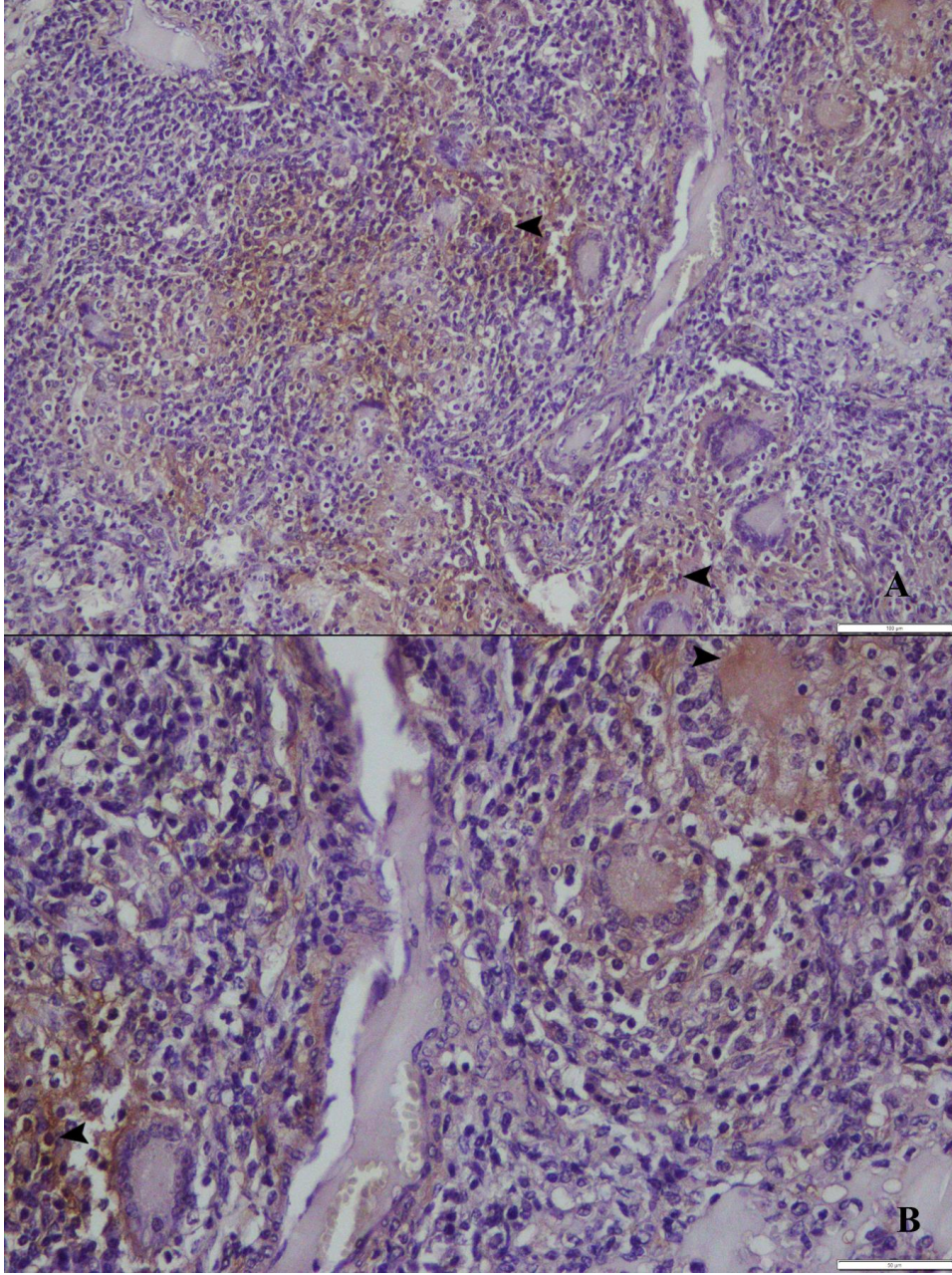
Şekil 4.10. Sığır, karaciğer **A)** Kontrol grubu OPN negatif, immunoreaksiyon, Streptavidin biyotin peroksidaz, Bar=100 µm. **B)** Enfekte hayvanda karaciğer hücrelerinde OPN pozitif immunoreaksiyon (siyah ok başları), Streptavidin biyotin peroksidaz, Bar=100 µm.

Tüberkülozlu sığır lenf düğümü dokusunun immunohistokimyasal boyamada kontrol grubuna kıyasla OPN ile artmış bir pozitif immunoreaksiyon verdiği görüldü. OPN'nin en yoğun olarak Langhans tipi dev hücrelerinde pozitif immunoreaksiyon verdiği saptandı (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. Sığır, lenf düğümü **A)** Kontrol grubu OPN negatif, immunoreaksiyon, streptavidin biotin peroksidaz, Bar=100 µm. **B)** Tüberküloz lezyonunda OPN pozitif immunoreaksiyon (kırmızı ok başları), streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=50 µm.

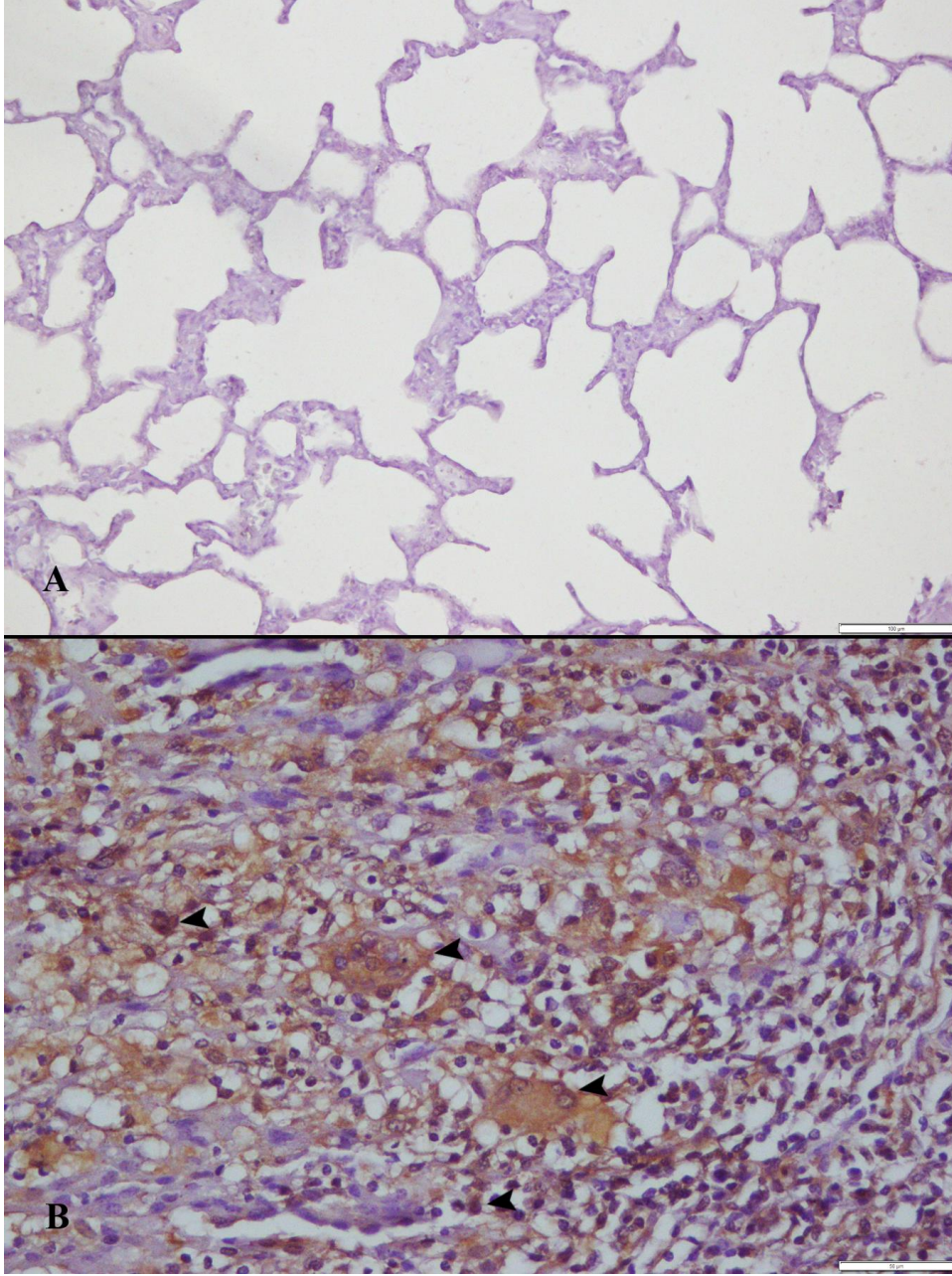
Lezyonlu sığır akciğer dokusunun immunohistokimyasal boyanmasında OPN'nin özellikle Langhans tipi dev hücrelerde kuvvetli pozitif immunoreaksiyon verdiği saptandı (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. Sığır, akciğer, Tüberküloz **A**) OPN pozitif immunoreaksiyon (siyah ok başları), streptavidin biotin peroksidaz, Bar=100 μ m, **B**) Büyük büyütmede Langhans tipi dev hücrelerde OPN pozitif immunoreaksiyon (siyah ok başları), streptavidin biotin peroksidaz, Bar=50 μ m.

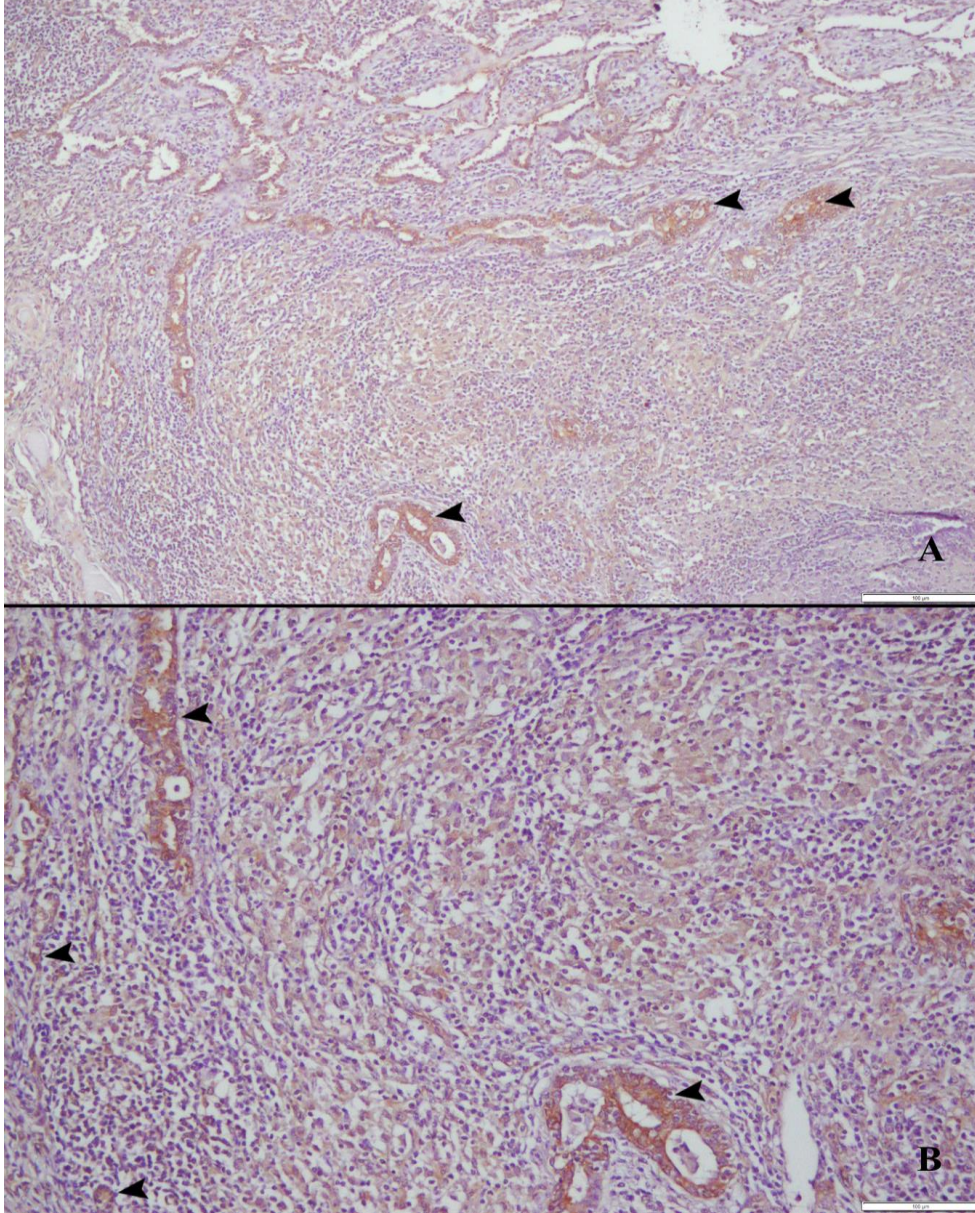
Kontrol grubu akciğerlerin immunohistokimyasal incelemesinde negatif SIRT immunoreaksiyonu saptanırken, Tüberkülozlu akciğer dokusunun immunohistokimyasal olarak belirgin şekilde artmış SIRT pozitif immunoreaksiyon

verdiği görüldü. SIRT pozitif immunoreaksiyon özellikle Langhans tipi dev hücrelerde, yangısal hücrelerde ve bronşiyol epitellerinde gözlendi (Şekil 4.13.).



Şekil 4.13. Sığır, akciğer **A)** Kontrol grubu, SIRT negatif boyanma, streptavidin biotin peroksidaz, Bar=100 µm **B)** Tüberkülozlu akciğerde Langhans tipi dev hücrelerde ve yangısal hücrelerde SIRT pozitif immunoreaksiyon (ok başları), streptavidin biotin peroksidaz, Bar=50 µm.

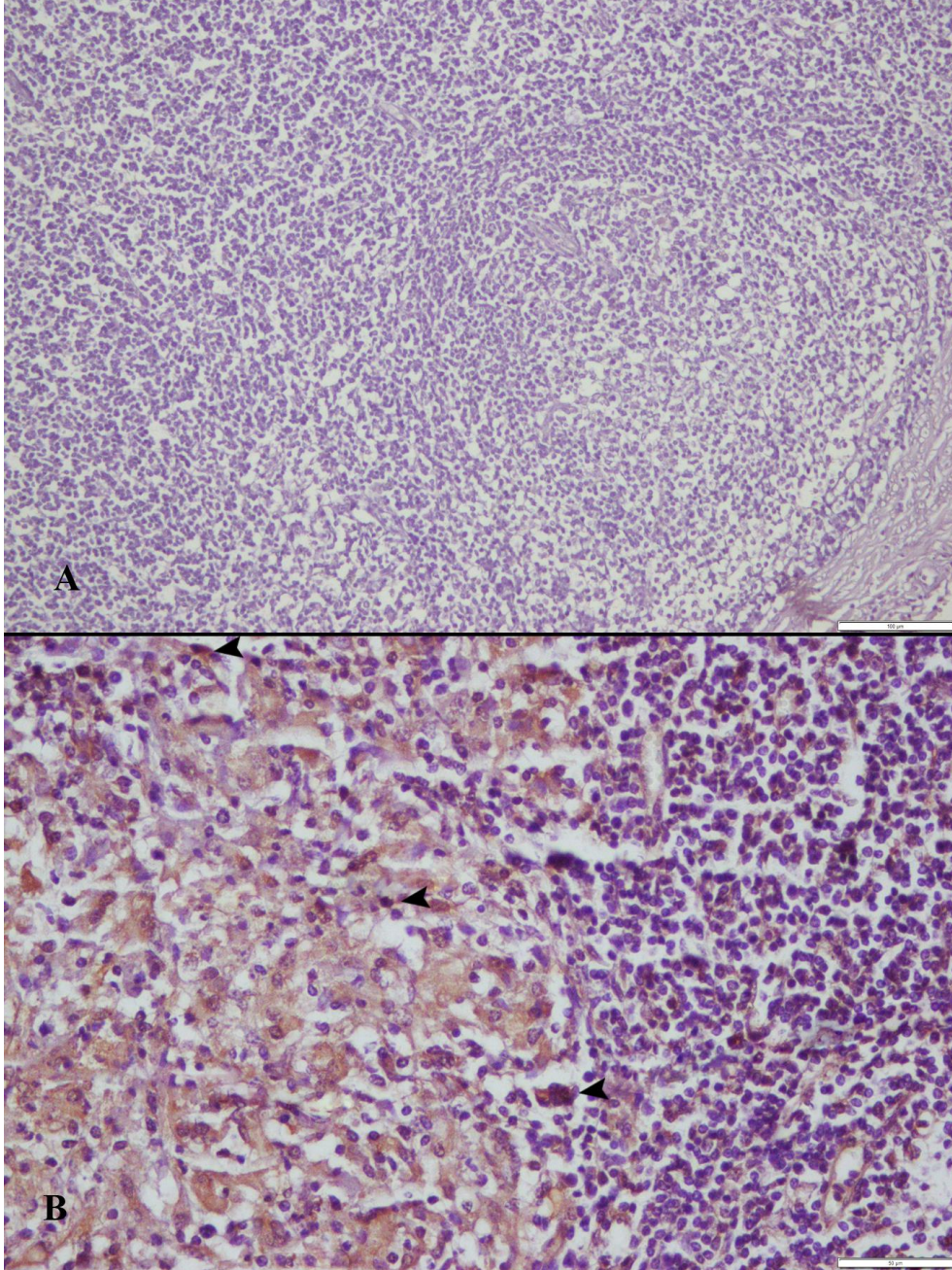
Lezyonlu sığır akciğer dokusunun immunohistokimyasal boyanmasının ardından farklı büyütmelelerde yapılan mikroskopik incelemede Sirtuinin bronşiyol epitellerinde belirgin şekilde pozitif immunoreaksiyon verdiği saptandı (Şekil 4.14.).



Şekil 4.14. Sığır, akciğer, Tüberküloz **A)** Bronşiyol epitellerinde artmış SIRT immunopozitif immunoreaksiyon (ok başları), streptavidin biotin peroksidaz, Bar=100 µm, **B)** Büyük büyütmede bronşiyol epitellerinde SIRT pozitif immunoreaksiyon (ok başları), streptavidin biotin peroksidaz Bar=50 µm.

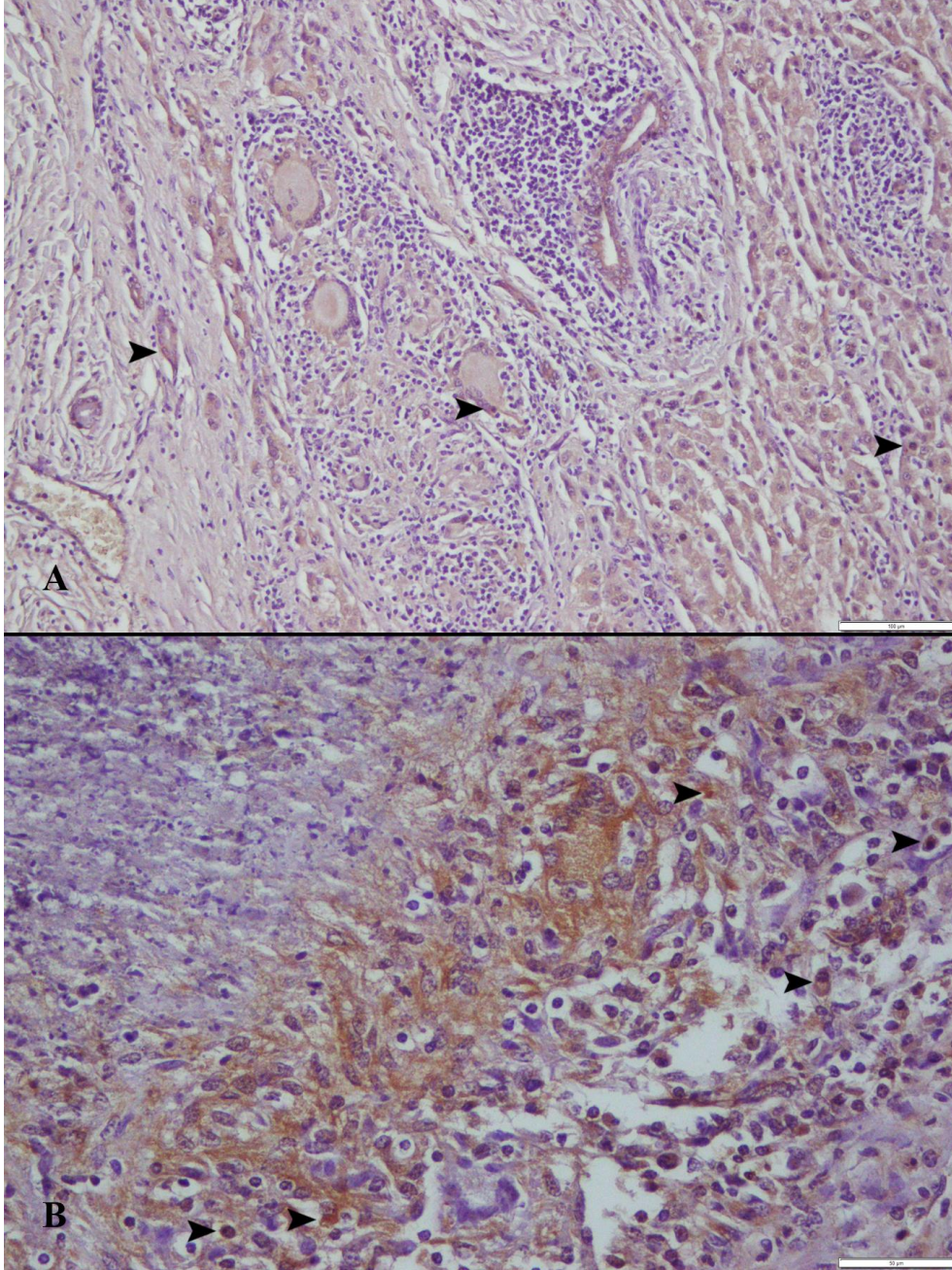
Akciğerlere benzer şekilde kontrol grubunda negatif immunoreaksiyon saptanırken tüberkülozlu sığır lenf düğümü dokusunda belirgin Sirtuin pozitif

immunoreaksiyon gözlendi. Sirtuinin en yoğun olarak Langhans tipi dev hücrelerinde immunoreaksiyon verdiği saptandı (Şekil 4.15.).



Şekil 4.15. Sığır, lenf düğümü **A)** Kontrol grubu SIRT negatif immunoreaksiyon, streptavidin biotin peroksidaz, Bar=100 µm **B)** Tüberküloz lezyonunda artmış SIRT pozitif immunoreaksiyon (ok başları), streptavidin biotin peroksidaz, Bar=50 µm.

Sığır tüberkülozlu karaciğerlerde de artmış Sirtuin pozitif immunoreaksiyon saptandı, SIRT pozitif immunoreaksiyon karaciğerde Langhans tipi dev hücrelerde, yangısal hücrelerde ve hepatositlerde gözlemlendi (Şekil 4.16.).



Şekil 4.16. Sığır, karaciğer, Tüberküloz **A)** SIRT pozitif immunoreaksiyon (ok başları), streptavidin biotin peroksidaz, Bar=100 µm **B)** Büyük büyütmede pozitif immunoreaksiyon gösteren hücreler (ok başları), streptavidin biotin peroksidaz, Bar=50 µm.

Çalışmamızda makro olarak saptanan Tüberküloz lezyonlarının histopatolojik yoklamasında orta kısımlarında belirgin kazeifikasyon nekrozu olan yer yer kalsifikasyonların bulunduğu, yoğun şekilde Langhans tipi dev hücreler, makrofaj ve lenfositlerin bulunduğu yangısal reaksiyon gözlemlendi. Bu hücrelerin etrafları bağ doku ile çevrilerek tipik tüberküller oluşturmuştu. Genellikle tüberküllerin birleşerek konglomere tüberküloz yapıların şekillendirdiği dikkati çekti. İmmunohistokimyasal olarak tüm lezyonlu dokularda OPN ve SIRT pozitif immunoreksiyonunun belirgin bir şekilde arttığı saptandı.

5. TARTIŞMA

M. bovis çoğunlukla sığırları, aynı zamanda domuz, kedi, köpek, koyun, keçi, at, kanatlılar ve insanları enfekte edebilen zoonotik bir hastalık olan tüberküloza sebep olur (56). İngiltere’de tüberkülozunun insidensi 1984 yılından beri artmış ve yıllık kaybın 2011 yılına kadar 1 milyar dolara ulaşabileceği bildirilmiştir (42). OIE’nin yapmış olduğu bir yayında bulaşmanın daha çok aerosol yolla oluştuğu ama kontamine materyalin oral yolla alınması sonucu da oluşabildiği rapor edilmiştir. Yine aynı çalışmada karakteristik tüberküloz lezyonlarının sıklıkla akciğer ve retrofarengeal, bronşiyol ve mediastinal lenf düğümlerinde oluştuğunu, ayrıca mezenteriyal lenf düğümleri, karaciğer, dalak, seröz membranlar ve diğer organlarda oluştuğunu belirtilmiştir (54). Yapmış olduğumuz çalışmada ise enfekte hayvanların tümünün akciğer dokusu ve akciğer dokusunu drene eden mediastinal lenf düğümlerinde tüberküloza ait karakteristik tüberkül lezyonlarına makroskobik olarak rastlanmıştır. Ayrıca enfekte hayvanların yedi tanesinde karaciğer dokusunda, bir tanesinde dalakta, bir hayvanda ise kalp dokusunda tüberküloz lezyonları saptanmıştır. Bu bulgularımız tüberkülozun en fazla akciğer ve mediastinal lenf düğümlerine yerleştiği ve solunum yolu ile bulaşmanın en önemli bulaşma şekli olduğu görüşünü desteklemiştir.

Ülkemizde sığır tüberkülozu ile mücadelede hastalığın görüldüğü işletmede tekli PPD intradermal deri testi, ikili PPD intradermal deri testi uygulanmakta olup, bakanlığın uygun bulunduğu durumlarda da IFN- γ testi uygulanabilmektedir (64). Ülkemizde yapılan bir çalışmada PPD deri testinin duyarlılığının %69.8, spesifitesini ise %98 olduğunu bildirmiştir (69). Avustralya’da yapılmış bir başka çalışmada IFN- γ testinin duyarlılığının %93.6 olduğu spesifitesinin ise tekli intradermal tüberkülin testinden daha düşük olduğu rapor edilmiştir (76). Bu bilgiler doğrultusunda sığır tüberkülozunun patogenezinin açığa kavuşturulup yeni teşhis yöntemleri geliştirilebilmesi düşüncesiyle çalışmamızda OPN ve SIRT aktivitesinin incelenmesine karar verilmiştir.

OPN, 1985 yılında sığır kemiğinin matriksinden izole edilmiş bir sialoproteindir (31). OPN’nin yara iyileşmesi, kanser, damar hastalıkları, biyomineralizasyon, yangılarda, obezite ve diyabet gibi birçok durumda aktivite gösterdiği belirtilmiştir (31,41). Pardo ve ark.(2005) yapmış oldukları bir çalışmada

normal akciğer dokusunda OPN aktivitesinin görülmediğini bildirmişlerdir (58). Lorena ve ark. (2005) yılında yapmış oldukları çalışmada normal fare ve rat karaciğerlerinin safra kanallarında osteopontin aktivitesine rastladıklarını bildirmişlerdir (39). Yapmış olduğumuz çalışmada kontrol grubunda bulunan hayvanların dokularının hiçbirinde OPN aktivitesine rastlanmamıştır. Windt ve ark. (2009) yılındaki çalışmalarında farelerin deneysel olarak *M.tuberculosis* ile enfekte edildikten sonra akciğer dokusundaki OPN aktivitesini immunohistokimyasal olarak incelemişler ve enfekte olmayan akciğer dokusunda herhangi bir aktiviteye rastlamadıkları halde, enfekte akciğer dokusunda bulunan alveolar makrofajlar ve lenfoid hücrelerde immunopozitiflik olduğunu bildirmişlerdir (75). O'Regan ve ark. (2001) OPN eksikliği oluşturulan fareler üzerinde yapmış oldukları çalışmada, OPN eksikliği olan farelerin granülom yapılarında makrofaj ve epitelooid hücre sayılarının kontrol grubu farelerdekine göre az olduğunu ve granülom oluşumunun geciktiğini göstermişlerdir (55). Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular yangısal durumlarda OPN aktivitesinin arttığı fikrini desteklemiştir. Enfekte hayvanların tüberküllerinde yer alan makrofaj ve Langhans tipi dev hücrelerde OPN aktivitesinin yoğun şekilde artması literatür bilgileriyle paralellik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda serum OPN seviyesinin aktif tüberküloz hastalarında yükseldiği bildirilmiştir (30,36,65). Benzer şekilde Dudemaine ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada paratüberküloz olgusu olan sığırlarda serum osteopontin seviyesinin yükseldiğini bildirmişlerdir (19). Ayrıca insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda miyelom, mezotelyom hastalarında (17,71), kronik kalp yetersizliği olan hastalarda (66) ve alkolik siroz hastalarında (60) serum OPN düzeylerinin yükseldiği rapor edilmiştir. Bu bilgiler ışığında sığır tüberkülozu olan hayvanların serum OPN düzeylerinin yükselmesinin mümkün olabileceği düşünülmüştür. Fakat birçok hastalık durumunda serum OPN seviyesinin yükseldiği bildirildiğinden sadece serum OPN düzeyinin sığır tüberkülozunun teşhisi amaçlı kullanılmasının yeterli olmadığı düşüncesine varılmıştır. Bu nedenle sürüde tüberküloz saptanan çiftliklerde PPD testi gibi testlerle beraber teşhise yardımcı bir kriter olarak incelenebileceği düşünülmektedir. Ayrıca çalışmamızın sonuçları OPN'nin tüberküloz patogenezinde önemli bir rol oynadığını da göstermiştir.

SIRT-1, nikotinamide adenin dinükleotid bağımlı üçüncü sınıf histon deasetilaz olarak adlandırılır. SIRT-1'in selüler apoptozisi baskıladığı, stres cevabını azalttığı ve yaşlanmanın önlenmesinde önemli olduğu bildirilmiştir (16). Chen ve ark. (2014) yapmış oldukları çalışmalarda insanlarda normal akciğer dokularında SIRT-1 yönünden immunohistokimyasal olarak hiçbir pozitif aktivitenin olmadığını bildirmişlerdir (16). Fareler üzerinde yapılan başka bir çalışmada 6 ve 24 aylık farelerin dokularında SIRT-1 yönünden immunohistokimyasal olarak çalışma yapılmış ve 6 aylık farenin akciğerinde herhangi bir immunaktivite gözlenmezken 24 aylık farelerin akciğerlerinde ise bazı alveolar epitel hücrelerin, mezotelial hücrelerde ve viseral plörada aktivitenin rastlandığı, iki grup arasında karaciğer dokusunda hiçbir aktivitenin gözlenmediği bildirilmiştir (39). Yapılan çalışmada da kontrol grubunda bulunan hayvanlardan alınan dokuların hiçbirinde SIRT-1 yönünden aktivite gözlenmemiştir. Cardoso ve ark. (2015) miyeloid SIRT-2 düzeyi geçici olarak azaltılmış farelere, *M. tuberculosis* etkeni uygulanmış ve uygulama sonucu kontrol grubu ile miyeloid SIRT-2 azaltılmış fareler arasında enfeksiyondan 60 ve 120 gün sonunda bakteriyel yükün ve tüberkülozda etkili olan gamma interferon, tümör nekroz faktör alfa, interleukin-6 ve interleukin-17 gibi sitokinlerin aktivitelerinde fark olmadığını bildirmişlerdir (12). Yapmış olduğumuz çalışmada tüberkülozlu sığırların enfekte dokularında bulunan makrofaj, epiteloid hücre ve Langhans tipi dev hücrelerde SIRT-1 yönünden belirgin immunopozitiflik saptanmıştır. Bu da SIRT aktivitesinin tüberküloz patogenezinde önemli rol oynadığını göstermiştir.

Yapılan literatür çalışmalarında sığır tüberkülozunda OPN ile SIRT aktivitesinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma sığır tüberkülozunda OPN ve SIRT aktivitesinin immunohistokimyasal yöntemlerle incelendiği ilk çalışmadır. Çalışmamızın sonuçları sığır tüberkülozunda bu markırların aktivitesinin arttığını göstermiştir. Buna göre tüberkülozun patogenezinde OPN ve SIRT proteinlerinin önemli rol oynadığı gösterilmiştir. OPN veya SIRT aktivitelerinin azaltılmasının tüberkül gelişimini etkileyip etkilemediğinin anlaşılabilmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır ve bu çalışma ileride yapılacak çalışmalar için öncü bir çalışma olacaktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kronik, bulaşıcı ve zoonoz karakterde bakteriyel bir hastalık olan sığır tüberkülozu bilinen en eski hastalıklardan biridir. Teşhisinin zor, tedavisinin de sığırlarda anlamlı olmaması sebebiyle halen bütün dünyada ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Günümüzde kullanılan sığır tüberkülozu teşhis yöntemleri sensitive ve spesifite açısından yetersiz kalmaktadır.

Çalışmamızda sığır tüberkülozlu hayvanların lezyonlu dokularında yapılan immunohistokimyasal incelemede OPN ve SIRT aktivitelerinin belirgin şekilde arttığı gözlenmiştir. Pozitif immunoreaksiyon veren alanların daha yoğun olarak, sığır tüberkülozunun histopatolojik tanısında önem taşıyan Langhans tipi dev hücreler ve bunların çevresinde yoğunlaştığı saptanmıştır.

Araştırmadan elde edilen bilgilerin ışığında, yaygın olarak insanlarda araştırılan ve çalışmamızda ilk defa sığır tüberkülozunda dokularda aktiviteleri belirlenen OPN ve SIRT aktivitelerinin, veteriner sahada hayvan hastalıklarında da çalışılması hastalıkların teşhis ve ayırıcı tanıda yardımcı olacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. **Adams ER, Nolan VG, Andersen SL, Peris TT, Terry DF** (2008): Centenarian offspring: start healthier and stay healthier. *J Am Geriatr Soc.*, **6**, 2089-2092.
2. **Anonim** (2014) Office International des Epizooties, World animal health situation, Handistatus 2. www.oie.int/hs2/report.asp. (Erişim Tarihi:07.01.2014).
3. **Aranaz A, Liebana E, Gomez-Mampaso E, Galán JC, Cousins D, Ortega A, Blázquez J, Baquero F, Mateos A, Suárez G, Domínguez L** (1999): *Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae subsp. nov.*: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int J Syst Bacteriol.*, **49**, 1263-1273.
4. **Ashford DA, Whitney E, Raghunathan P, Cosivi O** (2001): Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals. *Rev Sci Tech.*, **20(1)**, 325-37.
5. **Aydın N, İzgür M, Diker KS, Yardımcı H, Esendal Ö, Paracıkoğlu J, Akan M** (2006): *Mycobacterium İnfeksiyonları*. Editör: Yardımcı H. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar), İlke-Emek Yayınları, Ankara, s: 87-107.
6. **Bayram A, İğci M** (2013): Sirtuin genleri ve işlerleri. *Fırat Tıp Derg.*, **18(3)**, 136-140.
7. **Behr MA** (2001): A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine*, **17**, 915–922.
8. **Bergey DH, Holt JG, Krieg NAR, Sneath PHA** (1994): The mycobacteria. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9th, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, p: 113.
9. **Bitterman KJ, Anderson RM, Cohen HY, Latorre-Esteves M, Sinclair DA** (2002): Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regülatör of yeast sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem.*, **277**, 99-107.

10. **Buback F, Renkl AC, Schulz G, Weiss JM** (2009): Osteopontin and the skin: multiple emerging roles in cutaneous biology and pathology. *Exp Dermatol.*, **18**, 750-759.
11. **Bulfone-Paus S, Paus R** (2008): Osteopontin as a new player in mast cell biology. *Eur J Immunol.*, **38**(2), 338-341.
12. **Cardosa F, Castro F, Moreira-Teixeira L, Sousa J, Tarrado E, Silvestre R, Castro AG, Saraiva M, Pais TF** (2015): Myeloid Sirtuin 2 expression does not impact long-term Mycobacterium tuberculosis control. *Plos One.*, **10**, 7.
13. **Cassidy JP, Bryson DG, Neill SD** (1999): Tonsillar lesions in cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet Rec.*, **144**(6), 139-142.
14. **Caswell JL, Williams KJ** (2007): *Respiratory system*. Ed: Maxie MG. Pathology of domestic animals, Vol: 2, Fifth edition, Elsevier Ltd., Ontario, p: 607.
15. **Chalmers JW, Jamieson AF, Rafferty P** (1996): An outbreak of bovine tuberculosis in two herds in South West Scotland, Veterinary and Human public health response. *J Public Health Med.*, **18**, 54-58.
16. **Chen X, Hokka D, Maniwa Y, Ohbayashi C, Itoh T, Hayashi Y** (2014): Sirt1 is a tumor promoter in lung adenocarcinoma. *Oncol Lett.*, **8**(1), 387-393.
17. **Creaney J, Yeoman D, Musk AW, de Klerk N, Skates SJ, Robinson BW** (2011): Plasma versus serum levels of osteopontin and mesothelin in patients with malignant mesothelioma—Which is best?. *Lung Cancer*, **74**(1), 55-60.
18. **Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS** (2001): Osteopontin as a means to cope with environmental insults: Regulation of inflammation, tissue remodelling, and cell survival. *J Clin Invest.*, **107**, 1055–1061.
19. **Dudemaine PL, Fecteau G, Lessard M, Labrecque O, Roy JP, Bissonnette N** (2014): Increased blood-circulating interferon- γ , interleukin-17, and osteopontin levels in bovine paratuberculosis. *J Dairy Sci.*, **97**(6), 3382-93.
20. **Frye RA** (2006): Characterization of human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir 2-like proteins (sirtuin) metabolize NAD and may have

protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem Biophys Res Commun.*, **260**, 273-279.22

21. **Grange JM, Yates MD** (1994): Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet Microbiol.*, **40(1-2)**, 137-151.
22. **Guarante L, Partridge L, Wallace DC** (2008): *Molecular biology of aging*. Volume 51, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
23. **Gümüşsoy KS, Atasever A, Aydın F, Özcan M, Beyaz L, Hızlısoy H, Abay S** (2007): Prevalence of tuberculosis in cattle in Turkey. *Medycyna Wet.*, **63(3)**, 305-308.
24. **Gürel A** (2014): Tüberkülozis. <http://www.vetder.org/tuberculozis.html>. (Erişim Tarihi:07.12.2014).
25. **Haylock DN, Nilsson SK** (2006): Osteopontin: A bridge between bone and blood. *Br J Haematol.*, **134**, 467-474.
26. **Hazıroğlu R, Milli ÜH** (2001): *Veteriner Patoloji*, cilt 2, 2. Baskı, Medipres Matbaacılık Yayıncılık Medikal Veterinerlik Hiz. Hayvansal Ürünler Tic. ve Paz. Ltd. Şti., Ankara, s: 88-94.
27. **Hope JC, Villarreal-Ramos B** (2007): Bovine TB and the development of new vaccines. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*, **21**, 34-44.
28. **Hussain T** (2007): Leprosy and tuberculosis: an insight-review. *Crit Rev Microbiol.*, **33(1)**, 15-66.
29. **Imai S** (2011): Dissecting systemic control of metabolism and aging in the NAD World: the importance of SIRT1 and NAMPT-mediated NAD biosynthesis. *FEBS Lett.*, **585(11)**, 1657-62.
30. **Inomata S, Shijubo N, Kon S, Maeda M, Yamada G, Sato N, Abe S, Uede T** (2005): Circulating interleukin-18 and osteopontin are useful to evaluate disease activity in patients with tuberculosis. *Cytokine*, **30(4)**, 203-211.
31. **Kahles F, Findeisen HM, Bruemmer D** (2014): Osteopontin: A novel regülätör at the cross roads of inflammation, obesity and diabets. *Mol Metab.*, **3(4)**, 384-393.
32. **Katagiri K, Arakawa S** (2006): Osteopontin contributes Th2 immune responses: Spontaneous development of atopic dermatitis like lesion and enhanced asthma like response. *J Dermatol Sci.*, **42**, 148–149.

33. **Kazanecki CC, Uzwiak DJ, Denhardt DT** (2007): Control of osteopontin signaling and function by post-translational phosphorylation and protein folding. *J Cell Biochem.*, **102(4)**, 912–924.
34. **Keskin O** (2001): Sığır tüberkülozisinin teşhisinde ELISA'nın kullanılması ve allerjik yöntemle karşılaştırılması, *Vet Hekim Mikrobiyol Derg.*, **1(1)**, 11-18.
35. **Klar AJ, Fogel S, Macleod K** (1979): MAR1-a regulator of the HMa and HMalpha Loci in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **93**, 37-50.
36. **Koguchi Y, Kawakami K, Uezu K, Fukushima K, Kon S, Maeda M, Nakamoto A, Owan I, Kuba M, Kudaken N, Azuma M, Yara S, Shinzato T, Higa F, Tateyama M, Kadota J, Mukae H, Kohno S, Uede T, Saito A** (2003): High plasma osteopontin level and its relationship with interleukin-12-mediated type 1 T helper cell response in tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.*, **167(10)**, 1355-1359.
37. **Kon S, Ikesue M, Kimura C, Aoki M, Nakayama Y, Saito Y, Kurotaki D, Diao H, Matsui Y, Segawa T, Maeda M, Kojima T, Uede T** (2008): Syndecan-4 protects against osteopontin-mediated acute hepatic injury by masking functional domains of osteopontin. *J Exp Med.*, **205**, 25–33.
38. **Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN** (2007): *Temel Patoloji*, 8.baskı, Saunders Elseviers, s: 28.
39. **Kwon Y, Kim J, Lee CY, Kim H** (2015): Expression of SIRT1 and SIRT3 varies according to age in mice. *Anat Cell Biol.*, **48(1)**, 54-61.
40. **Lorena D, Darby IA, Gadeau AP, Leen LL, Rittling S, Porto LC, Rosenbaum J, Desmoulière A** (2006): Osteopontin expression in normal and fibrotic liver. Altered liver healing in osteopontin-deficient mice. *J Hepatol.*, **44(2)**, 383-390.
41. **Lund SA, Giachelli CM, Scatena M** (2009): The role of osteopontin in inflammatory processes. *J Cell Commun Signal.*, **3**, 311–322.
42. **Mathews F, Macdonald DW, Taylor GM, Gelling M, Norman RA, Honess PE, Foster R, Gower CM, Varley S, Harris A, Palmer S, Hewinson G, Webster JP** (2006): Bovine tuberculosis (mycobakterium

- bovis) in British farmland wildlife: the importance to agriculture. *Proc Biol Sci.*, **273**, 357-365.
43. **Mazzali M, Kpari T, Ophascharoensuk V, Wenson JA, Johnson R, Hughes J** (2002): Osteopontin—a molecule for all seasons. *QJM*, **95**(1), 3-13.
 44. **McKee MD, Nanci A** (1996): Secretion of osteopontin by macrophages and its accumulation at tissue surfaces during wound healing in mineralized tissues: a potential requirement for macrophage adhesion and phagocytosis. *Anat Rec.*, **245**(2), 394-409.
 45. **Menzies FD, Neill SD** (2000): Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet J.*, **160**(2), 92-106.
 46. **Michan S, Sinclair D** (2007): Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J.*, **404**, 1-13.
 47. **Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horrihawa I** (2005): Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT protein. *Mol Biol Cell.*, **16**, 4623-4635.
 48. **Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, Gagne DJ, Jin L, Boss O, Perni RB, Vu CB, Bemis JE, Xie R, Disch JS, Ng PY, Nunes JJ, Lynch AV, Yang H, Galonek H, Israelian K, Choy W, Iffland A, Lavu S, Medvedik O, Sinclair DA, Olefsky JM, Jirousek MR, Elliott PJ, Westphal CH** (2007): Small molecule activators of SIRT 1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature*, **450**, 712-6.
 49. **Neill SD, Cassidy J, Hanna J, Mackie DP, Pollock JM, Clements A, Walton E, Bryson DG** (1994): Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for ovine interferon-gamma. *Vet Rec.*, **135**(6), 134-135.
 50. **Neill SD, O'Brien JJ, Hanna J** (1991): A mathematical model for *Mycobacterium bovis* excretion from tuberculous cattle. *Vet Microbiol.*, **28**(1), 103-109.
 51. **North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E** (2003): The human Sir 2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell.*, **11**, 437-444.

52. **Nosho K, Shima K, Irahara N, Kure S, Firestein R, Baba Y, Toyoda S, Chen L, Hazra A, Giovannucci EL, Fuchs CS, Ogino S** (2009): SIRT1 histone deacetylase expression is associated with microsatellite instability and CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Mod Pathol.*, **22**, 922-932.
53. **OIE** (2008): Prescribed and alternative diagnostic test for OIE listed disease. Terrestrial Animal Health Code, Chapter 1.3, p: 1-5.
54. **OIE** (2009): Bovine tuberculosis. OIE Terrestrial Manual, Chapter 2.4.7, p: 1.
55. **O'Regan AW, Hayden JM, Body S, Liaw L, Mulligan N, Goetschkes M, Berman JS** (2001): Abnormal Pulmonary Granuloma Formation in Osteopontin-deficient Mice. *Am J Respir Crit Care Med.*, **164(12)**, 2243-2247.
56. **O'Reilly LM, Daborn CJ** (1995): The epidemiology of Mycobacterium bovis infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis.*, **76**, 1-46.
57. **Özbey G, Kalender H, Muz A** (2008): Sığır tüberkülozu'nun epidemiyolojisi ve teşhisi. *Fırat Üni. Sağ. Bil. Vet. Derg.*, **22(5)**, 307-314.
58. **Pardo A, Gibson K, Cisneros J, Richards TJ, Yang Y, Becerril C, Yousem S, Herrera I, Ruiz V, Selman M, Kaminski N** (2005): Up-Regulation and Profibrotic Role of Osteopontin in Human Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Plos Med.*, **2(9)**, 251.
59. **Patarca R, Freeman GJ, Singh RP, Wei FY, Durfee T, Blattner F, Regnier DC, Kozak CA, Mock BA, Morse HC 3rd, Jerrells TR, Cantor H** (1989): Structural and functional studies of the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene. Definition of a novel T cell-dependent response associated with genetic resistance to bacterial infection. *J Exp Med.*, **170(1)**, 145-161.
60. **Patouraux S, Bonnafous S, Voican CS, Anty R, Saint-Paul MC, Rosenthal-Allieri MA, Agostini H, Njike M, Barri-Ova N, Naveau S, Le Marchand-Brustel Y, Veillon P, Calès P, Perlemuter G, Tran A, Gual P** (2012): The Osteopontin Level in Liver, Adipose Tissue and Serum Is

Correlated with Fibrosis in Patients with Alcoholic Liver Disease. *Plos One.*, **7(4)**, 35612.

61. **Pollock JM, McNair J, Bassett H, Cassidy JP, Costello E, Aggerbeck H, Rosenkrands I, Andersen P** (2003): Specific delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 identify tuberculosis-infected cattle. *J Clin Microbiol.*, **41**, 1856-1860.
62. **Pritchard DG** (1988): A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. *J Comp Pathol.*, **99(4)**, 357-399.
63. **Raqib R, Rahman J, Kamaluddin AKM, Kamal SMM, Banu FA, Ahmed S** (2003): Rapid diagnosis of active tuberculosis by detecting antibodies from lymphocyte secretions. *J Infect Dis.*, **188**, 364-370.
64. **Resmi Gazete** (2009): Sığır Tüberkülozu Yönetmeliği. Tarih: 02.04.2009, Sayı: 27188. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2009/04/20090402-2.htm>, (Erişim tarihi: 07.12.2014).
65. **Ridruchai C, Sakurada S, Yanai H, Yamada N, Kantipong P, Piyaworawong S, Dhepakson P, Khusmith S, Keicho N** (2001): Association between circulating full-length osteopontin and IFN-gamma with disease status of tuberculosis and response to successful treatment. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.*, **42(4)**, 876-889.
66. **Rosenberg M, Zugck C, Nelles M, Juenger C, Frank D, Remppis A, Giannitsis E, Katus HA, Frey N** (2008): Osteopontin, a New Prognostic Biomarker in Patients With Chronic Heart Failure. *Circ Heart Fail.*, **1(1)**, 43-49.
67. **Rua-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS** (2006): Antemortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci.*, **81**, 190-210.
68. **Sauve AA, Wolberger C, Schramm VL, Boeke JD** (2006): The biochemistry of sirtuins. *Annu Rev Biochem.*, **75**, 435-65.
69. **Sayın Z** (2010): Sığır Tüberkülozunun Farklı Metodlar ile karşılaştırılması teşhisi. Selçuk Üniversitesi, Doktora Tezi.

70. **Scatena M, Liaw L, Giachelli CM** (2007): Osteopontin a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **27**, 2302–2309.
71. **Sfiridaki A, Miyakis S, Pappa C, Tsirakis G, Alegakis A, Kotsis V, Stathopoulos E, Alexandrakis M** (2011): Circulating osteopontin: a dual marker of bone destruction and angiogenesis in patients with multiple myeloma. *J Hematol Oncol.*, **4**, 22.
72. **Solmaz, H, İlhan Z, Aksakal A, Gülhan T, Ekin İH, Boynukara B** (2006): *Van Bölgesinde Sığır tüberkülozunun polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile saptanması*. VI. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslar Arası Katılımlı), Side-Antalya.
73. **Thoen CO, Barletta R** (2005): Pathogenes is of *Mycobacterium bovis*. In: *Mycobacterium bovis Infections in Animals and Humans*, Blackwell Publishing, Ames, IA.
74. **Vordermeier M, Goodchild A, Clifton-Hadley R, De la Rua R** (2004): The interferon-gamma field trial: background, principles and progress. *Vet Rec.*, **155**, 37-38.
75. **Windt GJ1, Wieland CW, Wiersinga WJ, Florquin S, van der Poll T** (2009): Osteopontin is not crucial to protective immunity during murine tuberculosis. *Immunology*, **128**, 766-776.
76. **Wood PR, Corner LA, Rothel JS, et al.** (1991): Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Aust Vet J.*, **68(9)**, 286-290.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Mustafa SEVTEKİN
Doğum Yeri ve Yılı : Afyonkarahisar-1982
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
Uyruđu : T.C.
Telefon No : 05436896088
Elektronik Posta : sevtekinm@hotmail.com
İletişim Adresi : G.T.H.B. İlçe Müdürlüğü
Sandıklı/Afyonkarahisar



Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Lisans: Akdeniz Üniversitesi Burdur Veteriner Fakültesi-2006

Yüksek Lisans:

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl (Mesleki Deneyim):

1. G.T.H.B. Eşme İlçe Müd. 2008-2012
2. G.T.H.B. Sandıklı İlçe Müd. 2012-

Üyesi Olduğu Mesleki Kuruluşlar

1. Afyonkarahisar Veteriner Hekimler Odası