



**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI
VPT-DR-2014-0001**

**SİĞİR HERPESVİRÜS-5 İLE DOĞAL ENFEKTE
BUZAĞILARDA NÖROPATOLOJİK BULGULAR VE
VİRÜSÜN APOPTOZİS İLE İLİŞKİSİ**

Erkmen Tuğrul EPİKMEN

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nihat TOPLU**

AYDIN-2014

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI
VPT-DR-2014-0001**

**SİĞİR HERPESVİRÜS-5 İLE DOĞAL ENFEKTE
BUZAĞILARDA NÖROPATOLOJİK BULGULAR VE
VİRÜSÜN APOPTOZİS İLE İLİŞKİSİ**

Erkmen Tuğrul EPİKMEN

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nihat TOPLU**

AYDIN-2014

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Patoloji Anabilim Dalı Veteriner Patoloji Doktora Programı öğrencisi Erkmen Tuğrul EPIKMEN tarafından hazırlanan “Sığır Herpesvirüs-5 ile doğal enfekte buzağılarda nöropatolojik bulgular ve virüsün apoptozis ile ilişkisi” başlıklı tez, 30.01.2014 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Unvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

İmzası

Prof. Dr. Nihat TOPLU

Adnan Menderes Üniversitesi

Prof. Dr. Tolga GÜVENÇ

OnDokuz Mayıs Üniversitesi

Prof. Dr. S. Serap BİRİNCİOĞLU

Adnan Menderes Üniversitesi

Prof. Dr. Mustafa SANDIKÇI

Adnan Menderes Üniversitesi

Doç. Dr. Recai TUNCA

Adnan Menderes Üniversitesi



Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun..... Sayılı kararıyla.....tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Sacide KARAKAŞ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Herpesvirüsler, insanlar ve memeli hayvanların birçoğunda enfeksiyon oluşturma yeteneğine sahip olmakla birlikte özellikle hayvancılık sektöründe oldukça geniş bir yer tutan sığır yetiştiriciliğinin önemli sorunları arasında yer almaktadır.

Herpesviridae ailesinde yer alan Sığır Herpesvirüs-5 (Bovine Herpesvirus-5=BHV-5) *Alphaherpesvirinae* alt ailesinde sınıflandırılan *Varicellovirus*'lerdendir. Virüsün neden olduğu salgınlar dünyanın birçok noktasından bildirilmiştir. Enfeksiyon en çok Güney Amerika'dan bildirilmekle birlikte, Avustralya, Kuzey Amerika ve Avrupa'da da görülmektedir.

Bu virüs ailesinin neden olduğu hastalıklardan önde gelen ve sıklıkla varlığı belirlenen tiplerinin yanısıra Türkiye'deki varlığı henüz çok fazla bilinmeyen ve üyesi olduğu virüs ailesi ile en önemli ortak özelliği latent enfeksiyona neden olması olan Sığır Herpesvirüs-5 enfeksiyonu özellikle buzağılarda ölümcül olabilen meningoensefalitis tablosuna sebebiyet vermektedir. Latent seyretmesi, aynı ailede yer alan antijenik özellikleri çok benzer diğer viral enfeksiyonların varlığı nedeniyle gözden kaçması ve olası buzağı kayıplarının nedenleri arasında yer almasından dolayı hayvan sağlığı ve hayvancılık ekonomisine yük getirmektedir.

Sığırlarda şekillenen diğer herpesvirüs enfeksiyonlarının aksine BHV-5'in patogenezi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu çalışma ile doğal enfekte buzağuların sinir sistemi bulguları histopatolojik olarak incelenmiş ve tanımlanmıştır. Bunun yanı sıra immunohistokimyasal metot ile viral antijen varlığı dokularda gösterilmiştir. Elde edilen veriler ile birlikte programlanmış hücre ölümü olarak bilinen ve viral hastalıklarda önemli rolü olan apoptozis, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) yöntemi ile dokularda belirlenerek apoptotik hücre ölümünün bu enfeksiyondaki yeri ortaya konmuştur. Ayrıca apoptotik yolların hangisi veya hangilerinin kullanıldığı anti aktif kaspaz-3-8-9 antikoları kullanılarak araştırılmıştır.

Alınan sonuçların özellikle doğal enfeksiyonlarda, enfeksiyon süreci ve virüs-konakçı etkileşiminin ortaya konması ile takip eden çalışmalara ışık tutabileceği düşünülmektedir. Hastalığın Türkiye'deki varlığının somut bir şekilde ortaya konması ile özellikle yavru hayvanlarda verim kaybı ve hatta ölümlere varan kayıplara neden olan ve sinirsel semptomlar ile seyreden benzer enfeksiyonların yanı sıra BHV-5'in de etiyolojiye yönelik araştırma planlarına alınması açısından farkındalık yaratacağı öngörülmüştür.

“Sığır Herpesvirüs-5 ile doğal enfekte buzağılarda nöropatolojik bulgular ve virüsün apoptozis ile ilişkisi” başlıklı bu çalışma, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VFZ-12012 proje kodu ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	I
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
SİMGELER ve KISALTMALAR	V
ÇİZELGELER	VI
RESİMLER	VII
ŞEKİLLER	IX
1. GİRİŞ	1
1.1. Etiyoloji	2
1.1.1. Herpesvirüslerin Sınıflandırılması	4
1.1.3. Herpesvirüslerin Yapısı ve BHV-5 Genomu	6
1.2. Epizootiyoloji	7
1.3. Patogenez	8
1.4. Bulgular	10
1.5. Apoptozis ve Viral Enfeksiyon	11
1.5.1. Apoptozisin Morfolojisi	13
1.5.2. Apoptozisin Oluşumuna Aracılık Eden Belirteçler	15
1.5.3. Apoptozisin Oluşum Mekanizmaları	19
1.5.3.1. İçsel yol ile apoptozis mekanizması	20
1.5.3.2. Dışsal yol ile apoptozis mekanizması	21
1.5.3.3. Endoplazmik retikulum stres yolu	22
1.5.4. Apoptozisin Tanısı	22
1.5.5. Viral Hastalıkların Patogenezinde Apoptozis	23
1.5.6. Virüslerin Neden Olduğu Apoptozisin Sınıflandırılması	24
1.5.6.1. Hızlı çoğalmayla apoptozisten kaçış	28
1.5.6.2. Antiapoptotik genlerle apoptozisten kaçış	28
1.5.6.3. Persiste enfeksiyon ile apoptozisten kaçış	29
1.5.6.4. Antiapoptotik aktiviteli RNA virüsler	31
1.5.7. Herpesvirüsler ve Apoptozis	32
1.5.7.1. Herpesvirüslerin U ₃ antiapoptozis geni	32
1.5.8. Viral Hastalıklarda Nekroz ve Apoptozis	33
1.6. Çalışmanın Amacı	34
2. GEREÇ ve YÖNTEM	35
2.1. Hayvan ve Doku	35
2.2. Histopatolojik İnceleme	35
2.3. İmmunohistokimyasal İnceleme	35
2.4. İmmunohistokimyasal Boyama Sonuçlarının Analizi	37
3. BULGULAR	39
3.1. Klinik Bulgular	39
3.2. Nekropsi Bulguları	39
3.3. Histopatolojik Bulgular	41
3.3.1. Serebral Hemisferler	42
3.3.2. Serebellum	44
3.3.3. Beyin Kökü	44

3.3.4. Medulla Spinalis	45
3.4. MSS'de BHV-5 Antijenin İmmunohistokimyasal Dağılımı	45
3.5. MSS'de Apoptozis Bulguları	48
3.5.1. TUNEL Pozitif Reaksiyonlar	48
3.5.2. Aktif Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9 ve Bcl-2 İmmunreaksiyonları	50
3.6. İmmunohistokimyasal Boyama Sonuçlarının Analizi	53
4. TARTIŞMA	57
5. SONUÇ	63
ÖZET	64
SUMMARY	65
KAYNAKLAR	66
TEŞEKKÜR	80
ÖZGEÇMİŞ	81

SİMGELER ve KISALTMALAR

%	Yüzde
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
°C	Santigrad derece
bp	Baz çifti
Bcl-2	B cell lymphoma-2
ml	Mililitre
ABC	Avidin-biotin peroksidaz kompleks
Ark	Arkadaşları
Apaf	Apoptotik peptidaz aktivatör faktör
BHV-1	Bovine herpes virüs-1
BHV-5	Bovine herpes virüs-5
Kaspaz	Cysteine aspartate spesifik protease (Caspase)
DAB	3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride
DNA	Deoksiribonükleikasit
IAP	Inhibitors of apoptosis (Apoptozis inhibitörleri)
RNA	Ribonükleikasit
HE	Hematoksilen ve eozin
HSV	Herpes simpleks virüs
ER	Endoplazmik retikulum
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
IL	İnterlökin
LAT	Latency associated transcript
kDa	Kilodalton
PBS	Fosfat tamponlu solüsyonu (Phosphate buffer saline)
pH	Asit ve alkali yoğunluğunun göstergesi
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt)-mediated dUTP-biotin nick end-labeling
VSV	Veziküler stomatitis virüs

ÇİZELGELER

Çizelge no	Açıklama	Sayfa
Çizelge 1.	Herpesvirüslerin sınıflandırılması ve BHV-5'in bu sınıflandırmadaki yeri.	5
Çizelge 2.	Apoptozis düzenlenmesinde etkili genler.	16
Çizelge 3.	Bcl-2 üyeleri.	16
Çizelge 4.	Kaspazların sınıflandırılması.	17
Çizelge 5.	Apoptozisin oluşumunda üç ana yol.	22
Çizelge 6.	Virüslerin apoptozis ile erken konakçı hücre ölümünün üstesinden gelmede uyguladığı stratejiler.	25
Çizelge 7.	Virüs enfekte hücrelerde, apoptozisin indüklenme zamanı ile viral replikasyon siklusu arasındaki ilişkiler.	26
Çizelge 8.	Nekropsisi yapılan hayvanlara ait olgu numarası, ırk, yaş, cinsiyet ve geldiği yer ile ilgili bilgiler.	39
Çizelge 9.	Başlıca histopatolojik lezyonların olgulara göre dağılım oranları.	43

RESİMLER

Resim no	Açıklama	Sayfa
Resim 1.	Serebral sulkuslarda genişleme ve ileri derecede konjesyon (Oklar), olgu no; 4.	41
Resim 2.	A. Tonsillerde şişkinlik (Oklar) ve konjesyon ile farinks mukozasında konjesyon, olgu no; 21 B. Sinus mukozası ve konkalarda konjesyon, olgu no; 21	41
Resim 3.	İdrar kesesinde şiddetli dilatasyon ve idrar retensiyonu (Oklar), olgu no; 7	42
Resim 4.	A. Paraventriküler alanda gliozis (Oklar), serebral hemisfer, olgu no; 12. HE. Bar=100 µm. B. Fokal glial odak (Oklar), serebral hemisfer, beyin, olgu no; 10. HE. Bar=30 µm. C. Diffüz glial hücre proliferasyonları, serebral hemisfer, olgu no; 15. HE. Bar=50 µm. D. Substansiya albada demyelinize sahalar, (Oklar), serebral hemisfer, olgu no; 18. HE. Bar=30 µm.	44
Resim 5.	A. Prolifere glial hücrelerde BHV-5 viral antijen immunopozitif reaksiyonlar (Oklar), serebral hemisfer, olgu no; 17. ABC metot. Bar=50 µm. B. Nöron çekirdekleri (Ok başları), sitoplazmaları ve uzantılarında (Oklar) BHV-5 viral antijen immunopozitif reaksiyonlar, serebral hemisfer, olgu no; 19. ABC metot. Bar=30 µm. C. Dejenere ve nekrotik Purkinje hücrelerinde BHV-5 viral antijen immunopozitif reaksiyonlar (Oklar), serebellum, olgu no; 15. ABC metot. Bar=30 µm. D. Dejenere ve nekrotik motor nöronlarda BHV-5 viral antijen immunopozitif reaksiyonlar (Oklar), medulla oblongata, olgu no; 7. ABC metot. Bar=30 µm.	48
Resim 6.	A. Dejenere ve nekrotik motor nöronların çekirdek, sitoplazma ve uzantılarında BHV-5 viral antijen immunopozitif reaksiyonlar (Oklar), medulla spinalis, olgu no; 18. ABC metot. Bar=50 µm. B. Nöron sitoplazmalarında (Oklar) BHV-5 viral antijen immunopozitif reaksiyonla, dorsal kök gangliyonu, olgu no; 18. ABC metot. Bar=50 µm.	49

- Resim 7. A. Kortekste, küçük ve büyük nöronların çekirdeklerinde (Oklar) ve glial hücre çekirdeklerinde (Ok başları) TUNEL pozitif reaksiyonlar, serebral hemisfer, olgu no; 8. TUNEL metot. Bar=30 µm. 51
B. Nöron çekirdeklerinde (Oklar) ve glial hücre çekirdeklerinde (ok başları) TUNEL pozitif reaksiyonlar, beyin kökü, olgu no; 12. TUNEL metot. Bar=30 µm.
C. Nöron çekirdeklerinde (Oklar) ve glial hücre çekirdeklerinde (Ok başları) TUNEL pozitif reaksiyonlar, serebellum, olgu no; 8. TUNEL metot. Bar=50 µm.
D. Nöron çekirdeklerinde (Oklar) ve glial hücre çekirdeklerinde (Ok başları) TUNEL pozitif reaksiyonlar, medulla spinalis, olgu no; 8. TUNEL metot. Bar=50 µm.
- Resim 8. A. Kortekste, glial hücreler (Ok başları), nöron sitoplazmaları ve uzantılarında (Oklar) aktif kaspaz-8 pozitif reaksiyonlar, serebral hemisferler, olgu no; 19. ABC metot. Bar=50 µm. 54
B. Glial hücrelerde (Oklar) aktif kaspaz-3 immunpozitif reaksiyonlar, serebellum, olgu no; 21. ABC metot. Bar=100 µm.
C. Nöron sitoplazmalarında (Oklar) aktif kaspaz-9 immunpozitif reaksiyonlar, beyin kökü, olgu no; 8. ABC metot. Bar=50 µm.
D. Nöron sitoplazmalarında (Oklar) Bcl-2 immunpozitif reaksiyonlar, serebral hemisfer, olgu no; 8. TUNEL metot. Bar=50 µm.

ŞEKİLLER

Şekil no	Açıklama	Sayfa
Şekil 1.	Serebral hemisferlerde pozitif hücrelerin dağılım oranları.	55
Şekil 2.	Serebellumda pozitif hücrelerin dağılım oranları.	56
Şekil 3.	Beyin kökünde pozitif hücrelerin dağılım oranları.	56
Şekil 4.	Medulla spinaliste pozitif hücrelerin dağılım oranları.	57

1. GİRİŞ

Herpesvirüsler, konak dağılımının çok geniş olması nedeniyle pek çok türde enfeksiyon oluşturabilmektedir (King ve Alroy 1996, Thiry ve ark 2006, Davison ve ark 2009). Sığırlarda da çok önemli hastalıklara neden olarak hayvan sağlığı ve hayvancılık ekonomisine büyük zararlar vermektedirler. (Davison ve ark 2009). Bu hastalıklar arasında infeksiyöz sığır rinotrakiti (IBR), sığır gangrenli nezlesi (CGB), yalancıkuduz (Aujeszky's hastalığı) gibi hastalıklar yer alır (Daniels ve ark 1988, Barker ve ark 1993, King ve Alroy 1996, Peshev ve ark 1998, Kliefert ve ark 2002, Muylkens ve ark 2007, Jones ve Chowdhury 2008, Nandi ve ark 2009, Cardoso ve ark 2010a).

Sığırlarda şekillenen viral meningoensefalitler içerisinde herpesvirüs ailesinin oluşturduğu enfeksiyonlardan sorumlu tutulan bovine herpesvirus-1 (BHV-1)'in nörojenik alt tipi yerine son yıllarda yapılan çalışmalarda bovine herpesvirus-5 (BHV-5) enfeksiyonları geçmiştir (Asbaugh ve ark 1997, Caron ve ark 2002, Maidana ve ark 2011). Antijenik ve genetik olarak birbirlerine oldukça benzerlik göstermelerine rağmen BHV-5'in BHV-1'e kıyasla çok daha güçlü nöropatojenitesi ortaya konmuştur (Asbaugh ve ark 1997, Caron ve ark 2002, Steiner ve ark 2010).

BHV-5, Alfa herpesvirüs alt ailesinde yer alan Varicellovirus'lardandır (King ve Alroy 1996, Mayo ve ark 2005, Thiry ve ark 2006, Davison ve ark 2009). BHV-5 sığırlarda sporodik epizootilere yol açan, genellikle ölümcül nonpurulent meningoensefalitlere neden olan viral bir patojendir (Caron ve ark 2002). Kısa bir replikasyon siklusuna (24 saat) sahiptir (Babuik ve ark 1996, Muylkens ve ark 2007). Diğer herpesvirüsler gibi gangliyon nöronlarında latent olarak kalabilirler ve bu nedenle tekrarlayan enfeksiyonlara da sıklıkla rastlanılmaktadır (Barringer ve Pisani 1994, King ve Alroy 1996, Redaelli 2010, Steiner ve ark 2010). BHV-1 ile antijenik ve genetik olarak yakından benzerlik gösteren BHV-5 arasında nükleotid homolojisi (%80) ve protein düzeyi benzerliği (%82) açısından önemli ilişki bulunmaktadır (Peshev ve ark 1998, Jones ve Chowdhury 2008, Steiner ve ark 2010, Maidana ve ark 2011). Viral DNA eşleştirmeleri ve genom haritasının belirlenmesi, takibinde yapılan kros nötralizasyon testleri ve monoklonal antikor reaktiviteleri, virüslerin genomik ve antijenik özellikleri bakımından farklı olduğunu ortaya koymuştur

(Steiner ve ark 2010). Bununla birlikte, en önemli biyolojik fark virüsler arasındaki nörovirulent potansiyeldir. BHV-5 güçlü nöropatojenitesiyle, buzağılarda, tavşanlarda ve immünyetmezlik gösteren fareler gibi deney hayvanlarında merkezi sinir sistemine bulaşım gösterip orada çoğalarak ölümcül olabilen ensefalitislere neden olurken (Lee ve ark 1999, Maidana ve ark 2011); nörotropik bir patojen olan BHV-1 daha zayıf nörovirulent özelliğiyle genellikle merkezi sinir sistemine (MSS) bulaşım göstermez ve herhangi bir nörolojik hastalıkta görülen, spesifik olmayan klinik semptomlara neden olur (Narita ve ark 1982, Muylkens ve ark 2007, Cardoso ve ark 2010b).

Klinik olarak, seröz burun akıntısı ve aksırma; çevreye karşı ilgisizlik ve anoreksi görülür (Cardoso ve ark 2010a, Pedraza ve ark 2010). Nörolojik belirtiler anoreksi ve depresyonla başlayan çenenin sıkılması ve hipersalivasyondur (Perez ve ark 2002). Bir sonraki aşamada kaslarda tremorlar, opistotonus, ataksi ve kafayı bir yere dayama gibi nöbet benzeri durum şekillenir (Chowdhury ve ark 1997, Caron ve ark 2002, Cardoso ve ark 2010a).

Nekropside belirgin bir makroskobik bulgu bildirilmemiştir (Chowdhury ve ark 1997). Karakteristik lezyon yoktur. Çok ender olarak polioensefalomalasi tanımlanmıştır (Cardoso ve ark 2007, David ve ark 2007, Cardoso 2010a).

1.1. Etiyoloji

Herpesvirüs ailesi pek çok önemli hastalığa neden olan, beşeri ve veteriner hekimlikte üzerinde en çok çalışılan, kolaylıkla tüm ortamlarda bulunabilen, kompleks genetik yapıya sahip, evrimsel süreçte oldukça fazla değişim göstermiş çok sayıdaki virüsü bünyesine alır (King ve Alroy 1996, Mayo 2005). *Herpesviridae* ailesi; balıklar, amfibiler, sürüngenler, kuşlar ve insanları da kapsayan memeliler gibi vertebralıları enfekte eden 100'den fazla tür içermektedir (Baringer ve Pisani 1994, Roizman ve Sears 2001, Whitley ve Roizman 2001, Thiry ve ark 2006). İnsan herpes virüslerinin neden olduğu iki önemli hastalığın (Herpes simpleks virüs ve Varicella-zoster virüs) karakteristik lezyonlarından yola çıkılarak bu virüs ailesine Yunanca “ερπειν“ (*herpein*), yani sürünme, sürüntü, sürülme anlamına gelen kelimedenden esinlenerek “Herpesvirüsler” adı verilmiştir (Thiry ve ark 2006). Günümüzde doğal konağı insan olan 8 farklı herpesvirüs identifiye edilmiştir.

Herpesvirüsler genellikle sınırlı bir alanda ve spesifik bir tür için patojendir, konaktan konağa direkt temas ve solunum yoluyla bulaşır (Muykens ve ark 2007). Bütün Herpesvirüsler, boyutu ve yapısı türe göre değişebilen çift zincirli DNA içeren büyük zarflı virionlardır. Herpesvirüslerin biyolojisi ve patolojisi çok önemli olmasına rağmen en önemli özellikleri primer enfeksiyondan sonra yaşam boyu devam eden latent enfeksiyona sebep olabilmeleridir (Ackermann ve ark 1982, Caron ve ark 2002, Vogel ve ark 2003). Herpesvirüslerin hepsi konak hücrenin çekirdeğinde replike olur. Viral DNA'dan RNA kopyası enfekte olan hücrenin çekirdeğinde oluşur. Enfeksiyon, viral partiküllerin konak hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlere temasıyla başlar. Viral zarf glikoproteinlerin hücre membran reseptörlerine bağlanmasını takiben virion parçalanarak hücreye penetre olur. Serbest kalan viral DNA, konakçı hücre çekirdeğine göç eder. Çekirdekte viral DNA'nın replikasyonu ve viral genlerin transkripsiyonu gerçekleşir (King ve Alroy 1996, Jones ve Chowdhury 2008, Brum ve ark 2010).

Semptomatik enfeksiyon sırasında, enfekte hücrelerde litik viral genler transkript olur. Bazı konak hücrelerde az sayıda LAT (latency associated transcript) adı verilen viral genler birikir (Lee ve ark 1999). Virüs bu sayede hücrede ve dolayısıyla konakçıda süresiz olarak kalıcı hale geçebilir. Primer enfeksiyonda klinik hastalık tablosu belirli zaman aralıklarında kendini gösterir. Uzun süreli latent enfeksiyonlarda semptomlar görülmez (Vogel ve ark 2003). Latent virüsün reaktivasyonu farklı hastalıklara zemin hazırlayabilir ve bu hastalıkların semptomlarıyla primer hastalığın belirtileri karıştırılabilir (Caron ve ark 2002). Aktivasyonu takiben viral genlerin transkripsiyonu LAT şeklinden multiple litik genlere doğru kayar ve böylece replikasyon ve virüs üretimi artmış olur (Silva ve ark 1999). Çoğunlukla litik aktivasyon hücre ölümüne öncülük eder (David ve ark 2007, Redaelli ve ark 2010). Klinik olarak litik aktivasyona sıklıkla düşük derecede ateş, düşünlük, lenf yumrularında şişlik ve palpasyonda hassasiyet gibi spesifik olmayan belirtiler eşlik eder (Boelaert ve ark 2005, Cardoso ve ark 2010). Aynı zamanda immunolojik bulgular arasında doğal katil hücre sayısındaki düşme dikkati çeker (King ve Alroy 1996, Boelaert ve ark 2005, Carter ve ark 2006, Nandi ve ark 2009). Herpesvirüsler konaklarına çok iyi adapte olurlar (Nandi ve ark 2009). Primer veya latent enfeksiyonlar sıklıkla klinik belirtilerle kendini gösterir (Silva ve ark 1999, Cardoso ve ark 2010). Özellikle immunsupresyonun şekillendiği belirli koşullarda herpesvirüsler klinik görünümün ağırlaşmasına ve böylece ölüme neden olabilirler (David ve ark 2007). Bunların yanı sıra

herpesvirüsler çeşitli kanserlerin etiolojisinde de yer tutar (Barringer ve Pisani 1994, Kerr ve ark 1994, King ve Alroy 1996, Redaelli 2010).

1.1.2. Herpesvirüslerin Sınıflandırılması

Herpesvirüsler; konak dağılımı, üreme siklusları, sitopatolojileri ve latent enfeksiyonlarının özelliklerine göre; Alfa Herpesvirüsler, Beta Herpesvirüsler ve Gama Herpesvirüsler olarak üç gruba ayrılır (King ve Alroy 1996, Peshev ve ark 1998, Mayo 2005, Davison ve ark 2009, Nandi ve ark 2009). BHV-5, 1992 yılında uluslararası virüs taksonomi komitesi tarafından ayrı bir virüs olarak onaylanmıştır (Roizman ve ark 1992). BHV-5, Alfa herpesvirüs alt ailesinde yer alan Varicellovirus'lardandır (King ve Alroy 1996) (Çizelge 1). Alfa Herpesvirüsler daha geniş bir konak dağılımı ve daha kısa bir replikasyon siklusuna (24 saat) sahiptir (Babuik ve ark 1996, Muylkens ve ark 2007). Nöron gangliyonlarında latent olarak kalabilirler. Beta Herpesvirüsler sınırlı bir konak dağılımı gösterir ve bu familya virüs grubu olarak hemen hemen sadece sitomegalovirüslerden oluşur (Nandi ve ark 2009). Sitomegalovirüslerle enfekte olan hücrelerde oldukça büyük, kolaylıkla fark edilebilen, genellikle intranükleer ve daha az olarak da intrasitoplazmik inklüzyon cisimcikleri şekillenir (sitomegalik inklüzyon cisimcikleri) (Barker ve ark 1993). Daha sonra enfekte olan hücreler viral replikasyon ya da konakçının immun sistemi ile parçalanırlar (Barker ve ark 1993, d'Offay ve ark 1995). Klinik iyileşmeyi takiben, sekretorik bezler (özellikle tükürük bezleri), böbrekler ve lenf yumruları gibi değişik doku ve organlarda persiste ya da latent enfeksiyon şekillenir (Boelaert ve ark 2005). Virüsün yaşam siklusu uzundur ve özellikle lenforetiküler hücrelerde latent olarak kalabilirler (Lee ve ark 1999). Alfa Herpesvirüslerde olduğu gibi tekrarlayan enfeksiyonlarla sıklıkla karşılaşılır (Vogel ve ark 2003, Nandi ve ark 2009). Gama Herpesvirüsler lenfotropik özellik gösterir. B ve T lenfositlere tropizm gösterir ve lenfoid dokularda latent olarak kalabilir (Lee ve ark 1999). Konakçı yelpazesi oldukça dardır ve virüs uzun süre lenfositlerde latent olarak kalır (King ve Alroy 1996, Boelaert ve ark 2005, Carter ve ark 2006, Nandi ve ark 2009).

Çizelge 1. Herpesvirüslerin sınıflandırılması ve BHV-5'in bu sınıflandırmadaki yeri

Alfaherpesvirüs Alt Ailesi	Betaherpesvirüs Alt Ailesi	Gamaherpesvirüs Alt Ailesi
<p>Simpleksvirus</p> <ul style="list-style-type: none"> • İnsan (alfa) herpesvirüs 1 (Herpes simpleks virüs 1) • İnsan (alfa) herpesvirüs 2 (Herpes simpleks virüs 2) • Sığır (alfa) herpesvirüs 2 (Sığır mammilitis virüs 2) <p>Varicellovirus</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sığır herpesvirüs 5 (BHV-5, sığırlarda ensefalitis) • Ördek enteritis herpes virüs (DEHV) • Ördek vebası virüsü, Avian herpesvirus 2 • İnsan (alfa) herpesvirüs 3 (Varicella-zoster virus) • Domuz (alfa) herpesvirüs 1 (Pseudorabies/Aujeszky's hastalığı virüsü) • Sığır (alfa) herpesvirüs 1 (IBR-Infectious bovine rhinotracheitis virus), vaginitis, balanopostitis ve sığırlarda abort. <ul style="list-style-type: none"> • Equine (alfa) herpesvirus 1 (Equine abortion virus) • Equine (alfa) herpesvirus 4 (Respiratory infection virus) • Feline herpesvirus 1 (FHV-1) • Canine herpesvirus (CHV) ("Fading puppy" syndrome virus) • Equine herpesvirus 3 (Coital exanthema) • Avian herpesvirus (Tavukların Infeksiyöz laringotrakeitisi) <p>Mardivirus</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gallid herpesvirus 2; Marek hastalığı <p>Itovirus</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gallid herpesvirus 1; hastalık: kanatlılarda infeksiyöz laringotrakitis 	<p>Cytomegalovirus</p> <ul style="list-style-type: none"> • İnsan (beta) herpesvirüs 5 (Human cytomegalovirus) <p>Muromegalovirus</p> <ul style="list-style-type: none"> • Murid (beta) herpesvirus 1 (Fare cytomegalovirus) • Domuz herpesvirüs 2 (Domuz cytomegalovirus) • Equid (beta) herpesvirus 2 (Equine cytomegalovirus) • Porcine herpesvirus 2 (İnklüzyon cisimcikli rinitis virüsü) • Bovine herpesvirus 4 (bovine cytomegalovirus) • Murid herpesvirus 2 (Rat cytomegalovirus) • Caviid herpesvirus 1 (guineapig cytomegalovirus) <p>Roseolovirus</p> <ul style="list-style-type: none"> • İnsan herpesvirüs 6; hastalıklar: erythema subitum, roseola infantum 	<p>Lymphocryptovirus</p> <ul style="list-style-type: none"> • İnsan herpesvirüs 4 ya da Epstein-Barr virus; hastalıklar, mononükleozis, Burkitt's lymphoma, nazofarengeal karsinom, Hodgkin's disease <p>Rhadinovirus</p> <ul style="list-style-type: none"> • Human herpesvirus 8, Saimiriine herpesvirus 2 • Alcelaphine herpesvirus 1; hastalık: Bovine Malignant Catarrhal Fever • Equine herpesvirus 2 causes equine cytomegalovirus infection. • Equine herpesvirus 5

(King ve Alroy 1996, Mayo 2005, Davison ve ark 2009)

1.1.3. Herpesvirüslerin yapısı ve BHV-5 genomu

Herpesvirüsler çift iplikli DNA içeren, ikozahedral kapsid simetrisine sahip, zarflı virüslerdir (Roizman ve ark 1992). Çift iplikli DNA genomu lineer yapıdadır (Delhon ve ark 2003). Viral genomu ikozahedral simetride 162 kapsomerden oluşan 100-110 nm çapında bir kapsid çevrelemektedir (Thiry ve ark 2006). Zarflı virüs 120-200 nm çapındadır (Baringer ve ark 1994, King ve Alroy 1996, Carter ve ark 2006). Nükleokapsidin etrafında konak hücre nükleus membranından virüs tarafından oluşturulmuş lipid bir zarf bulunur. Zarf üzerinde poliaminlar, lipidler ve glikoproteinler bulunmaktadır (Brum ve ark 2010).

Bu glikoproteinler 12 adettir ve gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM, gJ ve gN olarak adlandırılmışlardır (Brum ve ark 2010). Glikoproteinler antijenik yapıda olup, konakta immun yanıt oluşturmakta ve her virüse ayırt edici özellik kazandırmaktadır. Bütün herpesvirüslerde gB, gH, gL ve gM bulunur. BHV-5'te bunlara ek olarak virüsün nörovirülensi için oldukça önemli olan gE ve gI da yer almaktadır (Chowdhury ve ark 2000, Delhon ve ark 2003, Brum ve ark 2010). Glikoproteinlerin virüsün hücre içine girmesi sürecinde önemli rolleri vardır (Silva ve ark 2010). Bunlar sırasıyla; virion zarfı ve konak hücre membranların füzyonu, virüs partikülünün hücre içine girişi, virüsün hücreden hücreye geçişi, virüs tarafından indüklenen hücrelerin füzyonu ve konakçı immun sisteminden kaçış olarak belirtilebilir (Thiry ve ark 2006). Glikoproteinler bir veya daha fazla bulunan hidrofobik kısımları (domain) ile hücre reseptörüne tutunabilirler (Baringer ve Pisani 1994, Steiner ve ark 2010). Herpesvirüsler viral zarf ve konakçı hücre membranının füzyonu ile hücre içine girerler (Thiry ve ark 2006). Bunların dışında glikoproteinler, konağın immun sistemi ile etkileşime giren anahtar elemanlardır (Cardoso ve ark 2010a). gC kompleman sisteminin C3b komponentine bağlanır (Silva ve ark 2010). gE ve gI immunglobulin G'nin (IgG) Fc bölgesine bağlanarak bir kompleks oluştururlar (Delhon ve ark 2003, Silva ve ark 2010). Glikoprotein D'nin hayvan deneylerinde nötralizan antikor üretimini indüklediği gösterilmiştir (Nandi ve ark 2009).

BHV-5 genomu 138,390 baz çifti (bp) uzunluğundadır ve %75 oranında G+C kompozisyonundan oluşur (Chowdhury 1995, Delhon ve ark 2003, Maidana ve ark 2011). Total genom iki temel sekans biriminde incelenir (Meyer ve ark 1999). Bunlar; 104,054 bp uzunluğunda uzun birim (UL) ve 12,109 bp uzunluğunda kısa birimdir (US) (Engelhardt ve Keil 1996, Chowdhury ve ark 2002). Bu düzen D tipi herpesviral genom olarak adlandı-

rılır. BHV-5'te 72 gen bulunur (Chowdhury ve ark 2000). UL sekansı 60 gen içerir. Bunların başlıcaları; UL5, UL15, UL29 ve UL39 DNA replikasyon sürecinde rol alırken, tegument UL14 ve UL48, kapsid UL19 ile ilişkilidir (Delhon ve ark 2003). Örneğin UL44'ün kodladığı glikoprotein C (gC5) nörovirülens için gerekli değilken nörotropizm ve çok sayıda replikasyon için oldukça önemlidir (Liman ve ark 2000). Bu protein Alfaherpesvirüsler için konakçı hücrenin yüzey glikanlarına bağlanmada primer araçtır (Baines ve Roizman 1991, Liman ve ark 2000). Kısa birim olan US bölgesi 8 genden oluşur. Bunlar US1.67, US2, US3, US4, US6, US7, US8 ve US9'dur (Delhon ve ark 2003, Engelhardt ve Keil 1996). Örneğin US bölgesinin sonunda yer alan US1.67 geni virüs-konakçı interaksiyonlarında önemli yer tutar (Delhon ve ark 2003). Zarf ile kapsitin arasında bulunan materyal tegument olarak adlandırılır (Baines ve Roizman 1991). Tegument çok sayıda genin ürünlerini ve yaklaşık 20 protein içerir. Tegümentte bulunan UL41 adlı gen tarafından kodlanan "virion host shut off protein" (VHS) konak mRNA'sının yıkımını indükleyerek konağın protein sentezini durdurur (Roizman ve Sears 2001, Whitley ve Roizman 2001). VHS, substrat spesifitesi gösteren bir endoribonükleazdır. VHS bütün Alfaherpesvirüslerde homologdur (Baringer ve Pisani 1994, Steiner ve ark 2010). VHS virion içinde bulunur ve virüsün replikasyonunun erken fazında konağın protein sentezinin durdurulmasına aracılık eder. VHS proteininin bahsedilen bu özelliklerini ortaya koyması için bazı enzimlerin çalışması gerekir. Örneğin, herpes simpleks virüste ve BHV-5'te bulunan UL13 proteini bir viral protein kinaz olup, ICP0'ın (Infected cell protein), ve bazı proteinlerin sentezini düzenler (Baines ve Roizman 1991). UL13 proteini, VHS proteinini fosforilleyerek aktif hale getirip etkili olur. Bu şekildeki etkisiyle UL13 geninin, virüsün konağın protein sentezini durdurması için oldukça önemli olduğu görülmektedir (Roizman ve Sears 2001, Whitley ve Roizman 2001).

1.2. Epizootiyoloji

Sığır herpes 5 virüsü (BHV-5) sığırlarda sporodik olarak seyreden, nonpurulent meningoensefalitis ile sonuçlandığında genellikle ölümcül olabilen viral patojendir (Caron ve ark 2002, Cardoso ve ark 2010b). Sığırlarda şekillenen viral meningoensefalitiler içerisinde herpesvirüs ailesinin oluşturduğu enfeksiyonlardan sorumlu tutulan BHV-1'in

nörojenik alt tipi yerine son yıllarda BHV-5 enfeksiyonlarının neden olduğu görülmektedir. (Asbaugh ve ark 1997, Jones ve Chowdury 2008, Steiner ve ark 2010).

BHV-5'in neden olduğu meningoensefalitis salgınları dünyanın çeşitli yerlerinden rapor edilmiştir (Perez ve ark 2002, Cardoso ve ark 2007, Pedraza ve ark 2010). Sonradan BHV-5 enfeksiyonları olarak adlandırılan herpesvirüs ensefalitleri şeklinde görülen çeşitli salgınlar 1962'den beri bilinmekteydi (Cardoso ve ark 2010a-2010b). Enfeksiyon en çok Güney Amerika'dan (Arjantin, Brezilya) bildirilmekle birlikte (Perez ve ark 2002, Cardoso ve ark 2007, Pedraza ve ark 2010), Avustralya, Kuzey Amerika ve Avrupa'da da görüldüğü vurgulanmıştır (Pedraza ve ark 2002, Cardoso ve ark 2007). Amerika Birleşik Devletlerinde sığır ensefalitisiyle ilişkilendirilen enfeksiyon; Avrupa'da İtalya ve Macaristan'da izole edilmiş olup, Almanya ve doğu Avrupa ülkelerinde de büyük olasılıkla bulunduğu düşünülmektedir (Cardoso ve ark 2007, Maidana ve ark 2011).

Neonatal buzağular ve 6 aylık yaşa kadar olan buzağular enfeksiyondan etkilenir (Belknap ve ark 1994, Cascio ve ark 1999). Neonatal ya da 3 aylık yaşa kadar olan buzağular sinirsel semptomların şiddetli olduğu klinik bulgular gösterebilirler (Belknap ve ark 1994). Özellikle neonatal hayvanlarda ani ölümler görülebilir (Belknap ve ark 1994). Yaşları 4-5 aylık olan hayvanlarda klinik hastalık bulgusu görülmeden histopatolojik lezyonlar şekillenebildiği rapor edilmiştir (Cascio ve ark 1999, Caron ve ark 2002). Hastalığın özellikle 6-8 aylık yaştaki hayvanları etkilediğini ve bu yaştan daha büyük sığırlarda enfeksiyonun görüldüğü de belirtilir (Maidana ve ark 2011). İntranasal inokulasyonu takiben ilk haftada hafif ya da orta dereceli rinitis ve konjunktivitis görülür (Belknap ve ark 1994). Herhangi bir klinik bulgunun görülmediği asemptomatik olgular da mevcuttur. Bu noktada hayvanlar ya enfeksiyonu atlatarak iyileşirler ya da enfeksiyon nörolojik forma kayar ve hayvan ölür (Caron ve ark 2002).

1.3. Patogenez

Virüs, merkezi sinir sisteminin tüm bölgelerine olfaktor ve trigeminal yolları kullanarak nörondan nörona yayılım gösterir (Belknap ve ark 1994, Lee ve ark 1999, Perez ve ark 2002, Vogel ve ark 2003). Tavşanların model olarak kullanıldığı deneysel enfeksiyon ça-

lışmalarında merkezi sinir sisteminde virüs yayılımının ana yolunun olfaktor yol olduğu gösterilmiştir (Lee ve ark 1999). Buzağılarda, virüs merkezi sinir sistemine doğru nöronlar boyunca yayılım gösterdiğinden dolayı intranazal inokulasyondakine benzer şekilde intravaginal inokulasyon sonrası da ölümcül meningoensefalitis şekillenir (Lee ve ark 1999). İnokulasyon yollarına göre virüs öncelikle lokal yangıya neden olur. Konjunktival, nazal, vajinal yolla inokulasyon sırasıyla konjunktivitis, rinitis ve vulvovaginitise neden olur (Lee ve ark 1999, Thiry ve ark 2006, Cardoso ve ark 2010).

Deneysel olarak enfekte edilen hayvanlarda hastalığın seyri, kullanılan virüs izolatına, inokulasyon yoluna, hayvanın yaşı ve immunolojik durumuna bağlıdır (Meyer ve ark 1996, Lee ve ark 1999, Chowdhury ve ark 2000, Delhon ve ark 2003).

BHV-5 kısa bir replikasyon siklusuna sahiptir (King ve Alroy 1996). Latent enfeksiyon gangliyon nöronlarında mevcut olan virüs yükü ile meydana gelir (Perez ve ark 2002). Bu nedenle tekrarlayan enfeksiyonlar sıklıkla görülür (Barringer ve Pisani 1994, King ve Alroy 1996, Vogel ve ark 2003, Redaelli 2010, Steiner ve ark 2010). BHV-5'in neden olduğu ensefalitlerin patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır (Roizman ve ark 1992).

İntranazal inokulasyondan sonra primer enfeksiyonu takiben virüs solunum sistemi mukozasında çoğalır (Nandi ve ark 2009). 10-16 gün süre aralığında virüs ekstretlerde bulunur ve atılabilir (Silva ve ark 1999). Enfeksiyon sonrası ekstretlerdeki virüs miktarı 4. ve 6. günlerde en yüksek düzeye ulaşır (Meyer ve ark 1996). Primer enfeksiyondan sonra geçici viremi şekillenir ve virüs sekonder organlardan uzaklaşır (Pedreza ve ark 2010). Enfeksiyon yayılımının olası üç yolu vardır. Bunlar kan, sinir sistemi ve hücreden hücreye yayılım yollarıdır. BHV-5 solunum sistemi epitellerinde çoğalmayı indükler ve büyük olasılıkla intraaksonal transport mekanizmasıyla sinir sistemine ulaşır (Vogel ve ark 2003). Periferel sinir sistemi nöronları; özellikle nazal mukozanın trigeminal ganglion hücreleri ve olfaktor hücreleri enfekte olur (Lee ve ark 1999). Virüs, merkezi sinir sisteminin tüm bölgelerine olfaktor ve trigeminal yollarlı kullanarak nörondan nörona yayılım gösterir (Thiry ve ark 2006).

1.4. Bulgular

İnokulasyon yollarına göre virüs öncelikle lokal yangıya neden olur. Konjunktival, nazal, vajinal yolla inokulasyon sırasıyla konjuktivitis, rinitis ve vulvovaginitise neden olur (Lee ve ark 1999, Thiry ve ark 2006, Cardoso ve ark 2010).

Klinik olarak enfeksiyondan etkilenen hayvanlarda, seröz burun akıntısı ve aksırma; çevreye karşı ilgisizlik ve anoreksi görülür (Ely ve ark 1996, Caron ve ark 2002, Cardoso ve ark 2010). Nörolojik belirtiler anoreksi ve depresyonla başlayan çenenin sıkılması, diş gıcırdatma ve hipersalivasyondur. Bir sonraki aşamada, kaslarda tremorlar, nistagmus, opistotonus, ataksi, inkoordinasyon, kendi etrafında dönme ve kafayı bir yere dayama gibi nöbet benzeri durum şekillenir (Ely ve ark 1996, Caron ve ark 2002). Bu semptomların takibinde ölümle sonuçlanacak olan yatalak olmayı takiben görülen pedal çevirme hareketleridir (Perez ve ark 2002).

Nekropside belirgin bir makroskobik bulgu bildirilmemiştir. Karakteristik lezyon yoktur. Brezilya'da birkaç olguda latent enfeksiyonların reaktivasyonu sonucu polioensefalomalasi görüldüğü bildirilmiştir (David ve ark 2007, Cardoso ve ark 2007, Cardoso 2010).

Histopatolojik olarak, merkezi sinir sistemindeki lezyonlar; beyinin çeşitli bölgelelerinde olmakla birlikte özellikle frontal ve pariyetal korteks ile talamusta şekillenen meningitis, mononükleer perivasküler hücre infiltrasyonları, satellitozis, fokal ya da diffuz gliozis, hemoraji, dejenerasyon, nekroz, ödem ve nadiren de astrositler ve nöronlardaki inklüzyon cisimcikleridir (Asbaugh ve ark 1997, Chowdry ve ark 1997, David ve ark 2007, Silva ve ark 1999, Perez ve ark 2002, Cardoso ve ark 2010a, Pedraza ve ark 2010, Machado ve ark 2013).

İmmunohistokimyasal olarak, merkezi sinir sisteminde nöropilde ve kortekste yer alan nöronlarda antijenik pozitif boyanmalar görülür. Aynı zamanda benzer pozitif reaksiyonlar prolifer olmuş glial hücrelerde de mevcuttur (Belknap ve ark 1994, d'Offay 1995, Vogel ve ark 2003, Cardoso ve ark 2010a, Machado ve ark 2013).

1.5. Apoptozis ve Viral Enfeksiyon

Programlanmış hücre ölümü ya da hücre intiharı olarak da bilinen apoptozis; çok hücreli organizmaların organogenezisi sırasında ya da gelişimini tamamlamış canlılarda hem fizyolojik hem de patolojik olarak istenmeyen, hasar görmüş ya da potansiyel olarak tümöral yatkınlığı olan hücrelerin uzaklaştırılmasında başvurulan bir hücre intihar mekanizmasıdır (Wyllie 1980, Alles ve ark 1994, Nagata 1997, Cohen 1998, Irie ve ark 1998, Ferri ve Kroemer 2001, Kültürsay ve Kayıkçıoğlu 2002, Koyama ve ark 2003, Boya ve ark 2004, Elmore 2007). Bir başka deyişle, biyolojik sürecini tamamlamış ya da hasarlı hücrelerin, genetik olarak kendilerinde kodlanmış intihar programını devreye sokarak, programlı bir şekilde ve diğer sağlıklı hücrelere zarar vermeden yaşamlarını sona erdirmeleri olarak da tanımlanabilir (Lawrence ve ark 1997, Cohen 1998, Irie ve ark 1998, Öztürk 2002).

Apoptozis, dokuda hücrelerin tek tek ölümünü tanımlayabilmek için Yunanca'da "ağaçların yapraklarını dökmesi" anlamına gelen apo=ayrı, ptosis=düşen kelimelerinden türetilmiştir (Gewies 2003, Koyama ve ark 2003). Fizyolojik olarak oluşan hücre ölümü, uzun yıllardır bilinmesine rağmen "apoptozis" terimini ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie adındaki patologlar, sağlıklı karaciğer dokusundaki hepatositlerin fizyolojik hücre ölümünü belirtmek amacıyla, mitozun karşıt anlamında kullanmışlardır (Wyllie 1980, Green ve ark 1998, Öztürk 2002, Koyama ve ark 2003, Boya ve ark 2004). Bundan sekiz yıl sonra ilk kez Wyllie (1980), apoptozisi glukokortikoid eklenen doku kültüründe olgunlaşmamış timus hücrelerinde deneysel olarak oluşturmayı başarmıştır (Wyllie 1980).

Programlanmış hücre ölümü, embriyogenezis, organ involüsyonu (örn: timus), immünolojik reaksiyonlar ve diferansiye hücrelerin yaşam sürelerinin sonlanması gibi birçok fizyolojik olayda yer almaktadır (Wyllie 1980, Cooper 1994, Lawrence ve ark 1997, Gewies 2003, Elmore 2007).

Apoptozis, fetusta normal doku gelişiminin sağlanabilmesi için kullanılan temel mekanizmadır (Alles ve ark 1994). Bununla beraber, apoptozis erişkin doku gelişiminin sürdürülmesinde de anahtar bir rol oynar (Cohen 1998, Erdoğan ve Uzaslan 2003, Gewies 2003). Erişkin dokularda, hücre büyümesi ve apoptozis bir denge içindedir (Lawrence ve ark 1997). Bu dengenin bir yöne kayması çeşitli patolojik durumlara yol açmaktadır (Cooper 1994). Doku homeostazisi yani yeniden yapımın ve yıkımın bir düzen içinde oluşu, apoptozis/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır (Erdoğan ve

Uzaslan 2003, Gewies 2003). Son yıllarda, bu dengedeki bozulmalar birçok önemli hastalığın oluşumunda ve patogenezisinde rol aldığı gösterilmiştir (Nagata 1997, Koyama ve ark 2001). Hücre gruplarında apoptozis mekanizmasındaki aksamalar, çeşitli neoplastik oluşumlar, otoimmün hastalıklar ve viral enfeksiyonların patogenezisinde önemli roller üstlenmektedir (Cooper 1994, Cohen 1998, Koyama ve ark 2001, Kültürsay ve Kayıkçıoğlu 2002, Ozansoy ve Başak 2002). Örneğin, hücre proliferasyonundaki artış ve apoptozisteki azalma, karsinogenezisde en önemli bulgudur (Alles ve ark 1994, Erdoğan ve Uzaslan 2003).

Apoptozis, hücrenin yaşam siklusunda yapım-yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlar (Cooper 1994, Cohen 1998, Gewies 2003). Kemik iliğinde hücre üretimi devam ederken, günde yaklaşık 5×10^{11} kan hücresi apoptozis yolu ile yok edilmektedir (Cooper 1994). Her saniye yaklaşık bir milyon hücre apoptozisle vücuttan uzaklaştırılmaktadır (Alles ve ark 1994). Fizyolojik olarak ölen bu hücrelerin yerine yenileri yapılırken; yapım (mitoz) ve yıkım (apoptozis) arasında kontrollü bir denge vardır (Cooper 1994, Cohen 1998, Gewies 2003).

Apoptozisin hızının bozulduğu yani yavaşladığı veya arttığı hallerde çeşitli hastalıklar ortaya çıkar (Searle ve ark 1982, Ozansoy ve Bahar 2002). Apoptozisin yavaşladığı hastalıklara örnek olarak otoimmün hastalıklar ve kanser verilebilirken, gereksiz yere oluştuğu veya hızlandığı hastalıklara ise nörodejeneratif hastalıklar, insüline bağımlı tip diyabet ve AIDS gibi viral hastalıklar örnek gösterilebilir (Searle ve ark 1982, Ameisen ve Capron 1991, Alles ve ark 1994, Douglas ve ark 1994, Kerr ve ark 1994, Fukumori ve ark 1998, Irie ve ark 1998, Koyama ve ark 2001, Ozansoy ve Bahar 2002). Bunun yanı sıra çeşitli çevresel uyarılar apoptozisi başlatabilir (Koyama ve ark 2001). Hemen hemen tüm hücrelerde radyoaktif ışınlar, yangısal sitokinler, immüno-regülatör sitokinler, oksidatif stres, redoks potansiyelindeki değişiklikler, büyüme faktörleri veya trofik faktörlerin ortamdaki kaybolması, mekanik stres gibi durumlarda apoptozis tetiklenebilir (Cooper 1994, Douglas ve ark 1994). Hücrelerde antioksidan enzim yetersizliklerine bağlı reaktif oksijen radikallerinin artışı ile de apoptozis tetiklenebilir (Searle ve ark 1982, Cohen 1998). Viral bir enfeksiyon sırasında, normal şartlarda virüsler enfekte ettikleri hücrede kendi proteinlerini konak hücreye sentezletirler ve hücrenin kendisi için gerekli proteinlerin yapımını durdururlar (Koyama ve ark 2001). Bu yüzden virüsle enfekte olmuş hücrede apoptozis indüklenir ve hücre ölür (Cohen 1998). Böylece virüs kendisini de yok etmiş olur. Fakat bazı

virüsler, (ör: Ebstein-Barr virüs veya insan Papilloma virüsü) enfekte ettikleri hücrenin apoptozise gitmesini baskılayan yollar geliştirmişlerdir (Alles ve ark 1994, Thompson 1995). Bu virüslerden Ebstein-Barr virüs, apoptozisin uyarımını kontrol eden regülatörlerden biri olan Bcl-2'ye (B cell lymphoma-2, Bcl-2) benzer moleküller üreterek ve de Bcl-2 üretimini enfekte ettiği hücrenin sentezlemesini sağlayan moleküller üreterek apoptozise engel olmaktadır (Henderson ve ark 1991, Cooper 1994, Reed 1994, Irie ve ark 1998). Papilloma virüs ise apoptozisi engellemek için güçlü bir apoptozis indükleyicisi olan p53'ün etkinliğini önlemektedir (Douglas ve ark 1994, Thompson 1995, Everett ve Mc Faden 1999).

1.5.1 Apoptozisin Morfolojisi

Apoptozis, nekrozdan farklı olarak dokuda belli bir bölgedeki tüm hücreleri etkilemek yerine, dağınık olarak tek tek hücrelerde dikkati çeker ve de tipik bir yangısal değişik oluşturmaz (Kerr ve ark 1994, Boya ve ark 2004, Elmore 2007). Apoptoziste en belirgin morfolojik değişiklikler çekirdekte şekillenir, genellikle çekirdekte kromatin yoğunlaşır ve DNA parçalanır (Carson ve Riberio 1993). Elektron mikroskopta daha iyi gözlenebilen ilk morfolojik değişiklik; kromatinin çekirdek membranı boyunca yoğunlaşarak değişik boyutta yarım ay ya da oval şekillerde görülmesidir (Kerr ve ark 1994, Gewies 2003, Elmore 2007). Diğer bir önemli değişiklik ise, normalde hücre membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserinin aminofosfolipid transferaz enzimi aracılığı ile membranın dış yüzeyine doğru yer değiştirmesidir (Boya ve ark 2004). Bu değişim fagositoz için, apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasına olanak sağlar (Behnia ve ark 2000). Fagositik hücrelerin vitronektin, lektin özelliğindeki reseptörleri fosfatidilserin ile bağlanır ve fagositozu uyarır (Cohen 1998).

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt)-mediated dUTP- biotin nick end-labeling) yöntemde DNA boncuklanmalar şeklinde görülür, bunun nedeni DNA'nın endonükleaz ile oldukça düzenli bir biçimde nükleozomlar arası bölgelerden 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak biçimde kırılmasıdır (Walker ve ark 1993, Walker ve ark 1994, Gewies 2003). Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılrken, apoptoziste yaklaşık 300.000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı olanaksız hale gelir (Tornusciolo ve ark 1995, Narula ve ark 1997).

Çekirdekçik kromatini, çekirdek merkezinde osmiofilik granül kümeleri oluşturmak üzere dağılır. Merkezde kümelenen çekirdek kromatininin iç yüzeyinde fibriler proteinler birikerek yoğun granüler kitle oluşturur (Cooper 1994, Elmore 2007). Çekirdekteki bu değişikliklerle eş zamanlı olarak apoptotik hücreler, diğer hücrelere tutunmasını sağlayan yüzey yapılarını kaybederek, komşu hücrelerden ayrılır (Narula ve ark 1997). Apoptotik hücreler su kaybederek büzülürler, organeller birbirlerine yaklaşır ve sitoplazma sıvı yoğunluğu artar (Thomson 2001). Birkaç dakikada hacimlerinin 1/3'ünü kaybederler. Bu görünüm, muhtemelen plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarında aktivasyonun bozulmasından kaynaklanır (Carson ve Ribeiro 1993).

Sitoplazmik mikroflamanlar hücre yüzeyine paralel tabakalar oluşturacak şekilde yerleşerek kümeleşmeler gösterirler (Carson ve Riberio 1993, Öztürk 2002, Öviz 2004). Hücre membran bütünlüğü korunur (Cummings ve ark 1997). Mitokondriler genellikle normal yapılarını korurlar ve diğer organeller genel olarak sağlam olmalarına karşın, bazen ribozomlarda büzüşme ve endoplazmik retikulumda geçici genişlemeler görülebilir (Everett ve Mc Fadden 1999, Boya ve ark 2004). Bu genişlemelerin sitoplazmadaki suyun endoplazmik retikuluma geçmesi ile oluştuğu sanılmaktadır (Cummings ve ark 1997). Apoptotik süreç ilerledikçe, dilate olan sisternalar hücre zarı ile birleşerek hücre yüzeyine doğru tomurcuklanmalar şeklinde sitoplazmik çıkıntılar oluşmasına neden olurlar (Boya ve ark 2004). Daha sonra bu tomurcuklar kromatin parçalarını da içeren apoptotik cisimciklere ayrılırlar. Bu sırada hücre halen yaşamına devam ettirmektedir (Cummings ve ark 1997, Kerr ve ark 1994).

Hücre zarı ile kaplı olan DNA parçaları (Apoptotik cisimcikler) çevredeki hücreler ve makrofajlar tarafından fagositozla uzaklaştırılırlar (Cooper 1994). Apoptozis sırasında hücre içeriğinin hücreler arası ortama çıkmaması ve proteolitik enzimler ya da toksik oksijen salınımı olmaması nedeniyle yangısal yanıt gelişmez (Cummings ve ark 1997, Behnia ve ark 2000). Çok sayıda hücrenin apoptozisle yıkıldığı patolojik olaylarda, ortamdaki makrofajlar apoptotik cisimcikleri yeterince temizleyemezler ve uzaklaştırılmayan apoptotik cisimcikler sekonder olarak nekroza uğrayarak yangıyı tetikleyebilirler (Searle ve ark 1982).

1.5.2 Apoptozisin Oluşumuna Aracılık Eden Belirteçler

Apoptozis çok sayıda ve çeşitte mediatör tarafından düzenlenir (Cohen 1998). Bunlar arasında bazı iyonlar (Kalsiyum), moleküller (Seramid), genler (c-myc), proteinler (p53) ve hatta organeller (Mitokondri) bulunmaktadır (Cooper 1994, Cummings ve ark 1997, Green ve Kroemer 1998, Everett ve Mc Faden 1999, Boya ve ark 2004). Bazı mediatörler hücre tipine özgüdür, bazıları da apoptotik stimulusun çeşidine göre farklılık gösterebilirler (Green ve Kroemer 1998, Boya ve ark 2004). Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli kalsiyum girişi olur (Cummings ve ark 1997). Kalsiyum iyonları endonükleaz aktivasyonunda, doku transglutaminaz aktivasyonunda, gen regulasyonunda, proteazların aktivasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol alabilirler (Elmore 2007). Fakat hücreye kalsiyum girişi apoptozisin gerçekleşmesi için zorunlu değildir (Cooper 1994).

Bcl-2 ailesi, üyelerinin bir kısmının apoptozisi indüklediği (Bax, Bad, Bid, Bcl-Xs), bir kısmının ise inhibe ettiği (Bcl-2, Bcl-X₁) geniş bir ailedir (Reed 1994) (Çizelge 2, Çizelge 3) (Kerr ve Harmon 1991, Reed 1994, Enari ve ark 1995, Koyama ve Adachi 1997, Koyama ve ark 1998, Green 2005, Elmore 2007). Bu ailenin üyeleri kendi aralarında homo veya hetero-dimerler oluştururlar (Lawrence ve ark 1997). Hücrenin yaşayabilirlik durumu bu ailenin proapoptotik ve antiapoptotik üyelerinin rölatif oranına bağlıdır (Henderson ve ark 1991). Bu heterodimerlerden biri olan Bcl-2/Bax'ın bazı hematolojik malignensilerde prognostik değer taşıdığı rapor edilmiştir (Reed 1994, Gewies 2003). Çünkü oranın artması ya da azalması apoptozisin inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanır (Lagunoff ve Carrol 2003, Boya ve ark 2004). Bu da prognozu belirleyici bir unsur olabilir (Reed 1994). Yapılan çalışmalarda Bcl-2 geni, ilk olarak insan B hücreli foliküler lenfomada tanımlanmıştır (Henderson ve ark 1991, Carson ve Riberio 1993, Cohen 1998). Bcl-2'nin ayrıca mitokondri ile olan ilişkisinden dolayı antioksidan bir etkiye sahip olduğu ve böylece oksidan stresin neden olduğu apoptozisi baskılayabildiği bulunmuştur (Cohen 1998, Green ve Kroemer 1998, Boya ve ark 2004).

Çizelge 2. Apoptozis düzenlenmesinde etkili genler.

Apoptozisi baskılayan genler	Apoptozisi indükleyen genler
<ul style="list-style-type: none"> Bcl-2 ailesinden BHRL-1, bcl-xl, bcl-w, bfl-1, brag-1, mcl-1, A1 c-abl geni ras onkogeni çözünebilir fas p35 A20 	<ul style="list-style-type: none"> Bcl-2 ailesinden Bad, Bax Bak, Bcl-xS, bad, bik, Hrk1 c-myc p53, p21 fas (CD95/APO1), FADD / MORT, RIP, FAST interlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (ICE) LOH (MTS1/CDK41)

(Kerr ve Harmon 1991, Reed 1994, Enari ve ark 1995, Koyama ve Adachi 1997, Koyama ve ark 1998, Elmore 2007)

Çizelge 3. Bcl-2 üyeleri.

Antiapoptotik	Proapoptotik
Bcl-2	Bax Blk
Bcl-xl	Bod Bak
Boo	Bcl-xs
Bcl-w	Bid
A1	Bim
Mcl-1	

(Reed 1994, Koyama ve Adachi 1997, Koyama ve ark 1998, Green 2005, Elmore 2007)

Apoptozisin düzenlenmesinde görev alan Cysteine Aspartate Specific Protease'lar (Caspase/Kaspaz) olarak adlandırılan proteazlar aspartik asitten sonraki peptid bağımlı kırarlar (Cooper 1994, Green ve Kroemer 1998, Thornberry ve Lazebnik 1998, Wang 2000, Boya ve ark 2004). Aktif merkezlerinde sistein bulunduğundan bu isim verilmektedir (Thornberry ve Lazebnik 1998). Hücrede inaktif (Zimojen) olarak bulunurlar ve proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler (Green ve Kroemer 1998).

Başlatıcı kaspazlar veya etkin kaspazlar olarak sınıflandırılabilirler (Çizelge 4). Kaspaz aktivasyonu (Dimerizasyonu) ya hücre yüzey ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ya da kaspaz-9 bağlayıcı protein olan apoptotik peptidaz aktivatör faktör-1 (Apaf-1)'in oligomerize olmak üzere indüklenmesi ile gerçekleşir (Thornberry ve Lazebnik 1998, Wang 2000, Liston ve ark 2003). Apaf-1'in indüksiyonu ise sitokrom c'nin mitokondriden salıverilmesi ile gerçekleşir (Green ve Kroemer 1998, Thornberry ve Lazebnik 1998, Boya ve ark 2004).

Memelilerde belirlenen toplam 14 kaspazın 12 tanesi insanda tespit edilebilmiştir (Carson ve Riberio 1993, Wang 2000). Her ne kadar tüm kaspazlar direk olarak apoptozis mekanizmalarının içerisinde yer almasa da hepsinin organizmada biyolojik önemi bulunmaktadır (Cooper 1994, Green ve Kroemer 1998, Wang 2000, Boya ve ark 2004). Örneğin, Kaspaz-1, 4 ve 5 yangısal sitokinlerin öncü moleküllerinin yapımını düzenler. Özellikle pro-interlökin-1 β (Pro IL-1 β) ve pro-IL-18 düzenlenmesi bu kaspazların kontrolündedir (Wang 2000, Liston ve ark 2003).

İnterlökin-1 beta converting enzim (ICE veya kaspaz-1) geniş kaspaz ailesinin ilk tanımlanan üyesidir (Cooper 1994). Kaspazlar benzer aminoasit dizilimine sahiptirler, yapısal ve substrat spesifikliğı de benzer özellikleri paylaşır (Wang 2000).

Çizelge 4. Kaspazların sınıflandırılması.

Kaspaz	Özellikleri
Grup I (Başlatıcı) 2, 8, 9, 10	Uzun prodomaine sahip başlatıcı kaspazlardır. Kaspaz 6 kısa prodomaine sahiptir.
GrupII (Etkin) 3, 6, 7	Kısa prodomaine sahip etkin kaspazlardır. Kaspaz 2 uzun prodomaine sahiptir.
Grup III 1(ICE), 4, 5, 11, 12, 13, 14	Yangısal yanıtın düzenlenmesinde rol oynar.

(Koyama ve Adachi 1997, Koyama ve ark 1998, Liston ve ark 2003)

Seramid, membrana bağlı asid sfingomyelinaz aktivasyonunun bir ürünüdür. Plazma membran hasarına karşı bir sinyal olduğu düşünülmektedir (Cummings ve ark 1997).

p53, hücrede bir şekilde (Radyasyon, kemoterapi) DNA hasarı oluştuğunda, eğer hasar onarılabilir düzeyde ise hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve hücreye DNA'sını tamir edebilmesi için zaman kazandırır (Carson ve Riberio 1993, Cooper 1994, Everett ve Mc Faden 1999). Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda p53 apoptozisi indükler ve bu şekilde p53'n apoptozisi indüklemesi, Bax'ın ekspresyonunu arttırması ile Bcl-2/Bax oranını değiştirmesi yoluyla gerçekleşir (Everett ve Mc Faden 1999). Bazı virüsler (Papillom virüsü, adenovirüs tip 12) ya p53' iaktive ederek ya da Bax'a bağlanarak apoptozisi bloke ederler, ancak apoptozisten kurtulan bu enfekte hücreler virüsle indüklenen karsinogenezis mekanizmasına yenik dşerler (Kerr ve Harmon 1991).

Sitokrom c, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteindir (Cooper 1994, Boya ve ark 2004). Apoptozis sürecinde merkezi bir konuma oturmuştur. Bu yüzden de sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesi, apoptozis yoluna girmiş bir hücrede apoptotik ölümün gerçekleşmesi için oldukça önemli bir safhadır (Cummings ve ark 1997, Gewies 2003). Mitokondriden apoptozis indükleyici faktör (AIF) ile birlikte sitoplazmaya salınır. Sitokrom c, sitoplazmik protein olan Apaf-1'e bağlanır ve onu aktive eder, ardından ATP'nde katılımıyla inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesiyle apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur (Lawrence ve ark 1997, Mason 1999, Wang 2000). Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz-3' aktive eder. Aktif kaspaz-3, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD) inaktifleştirir, böylece ICAD'nin bağladığı kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD) serbestleşir ve bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin yoğunlaşmasına ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur (Cooper 1994, Thornberry ve Lazebnik 1998). Buraya kadar anlatılan kaspaz bağımlı mekanizmanın yanı sıra kaspaz bağımsız apoptozis varlığı da bilinmektedir (Elmore 2007). Kaspaz bağımsız apoptozis yine mitokondriden salıverilen bir faktör olan AIF etkisiyle gerçekleştirilir (Mason 1999, Wang 2000). Kaspazlar, zimojen olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimdir (Cummings ve ark 1997, Green ve Kroemer 1998, Wang 2000, Gewies 2003, Boya ve ark 2004). Kaspaz şelalesi, sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesiyle prokaspaz-9'un aktivasyonu yoluyla aktifleştirildiği gibi, kaspazlar da sitokrom c'nin salıverilmesine neden

olabilirler (Irie ve ark 1998, Wang 2000). Bir kaspaz inhibitörleri ailesi olan IAP'ler (Inhibitors of apoptosis) kaspazları selektif olarak inhibe ederler, böylece apoptotik mekanizmayı durdururlar (Lawrence ve ark 1997, Liston ve ark 2003). Bu inhibitörler birçok malign hücreler tarafından aşırı eksprese edilmektedirler. IAP'ler ayrıca hücre siklusunu da etkileyerek apoptozisi durdurabilirler (Mason 1999).

Granzimler, patojenle enfekte edilmiş hücrelerin veya tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında etkin rol alırlar (Lawrence ve ark 1997, Gewies 2003, Elmore 2007). Perforinler ve granzimler normal olarak sitotoksik T-lenfositlerin ve doğal katil hücrelerin sitoplazmik granüllerinde bulunurlar (Douglas ve ark 1994). Sitotoksik T-lenfositlerin hedef hücreye bağlanmasıyla perforinler salgılanır ve bu perforinler hedef hücrenin membranına bağlanarak membranda porlar meydana getirirler (Thomson 2001). Porlar, sitozolik kalsiyum düzeylerinin hızla artmasına yol açar (Gewies 2003). Perforinin beraberinde salgılanan ve bir serin-proteaz olan granzimin de bu porlar aracılığıyla hücreye girmesiyle hücre içinde prokaspaz-8'in aktivitesi, dolayısıyla kaspaz şelalesi başlatılır ve bu da enfekte hücreyi veya kanser hücrelerini apoptozise götürür (Douglas ve ark 1994, Kerr ve ark 1994, Thornberry ve Lazebnik 1998, Gewies 2003).

1.5.3. Apoptozisin Oluşum Mekanizmaları

Apoptozis memelilerde ölüm sinyalinin kaynağına bağlı; mitokondri aracılı içsel (İntrinsik) ve ölüm reseptör aracılı dışsal (Ekstrinsik) yollarla gerçekleşir (Cooper 1994, Cummings ve ark 1997, Ferri ve Kroemer 2001, Elmore 2007). Buna ilaveten apoptozis endoplazmik retikulum stres yoluyla da indüklenebilmektedir (Çizelge 5). İçsel yol onkogen aktivasyonu, DNA hasarı gibi hücrenin kendisinden kaynaklı çok çeşitli sinyaller tarafından tetiklenir (Everett ve Mc Fadden 1999, Ferri ve Kroemer 2001). Dışsal yolda ise, apoptozis genellikle stitokinlerin hücre zarında bulunan ölüm reseptörlerine bağlanması sonucu başlatılır. Bu yolların fazları bir grup sitosolik kaspazlar tarafından yürütülür ve düzenlenir (Wang 2000, Ferri ve Kroemer 2001, Boya ve ark 2004).

1.5.3.1 İçsel yol ile apoptozis mekanizması

Mitokondri içsel yol ile tetiklenen apoptozis sürecinde anahtar rol oynar (Green ve Kroemer 1998, Green 2005). Çeşitli apoptotik uyarıcılar mitokondrinin dış zarının geçirgenliğini arttırarak intermembranal boşlukta bulunan sitokrom c, SMAC/DIABLO, AIF, EndoG ve OMI/HTRA2 gibi bazı proteinlerin sitoplazmaya geçişine yol açar (Liston ve ark 2003). Mitokondri membran permeabilitesi Bcl-2 protein ailesi tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir (Henderson ve ark 1991, Nagata 1997, Ferri ve Kroemer 2001). Mitokondrinin dış zarında oluşan bu geçirgenlik artışı apoptozis sürecindeki en önemli kritik devreyi oluşturmakta ve Bcl-2 protein ailesinde bulunan proapoptotik (Bax, Bim, Bid, Bak, Noxa) ve antiapoptotik (Bcl-2, Bcl_{XL}, Bcl-w) proteinlerin karşılıklı etkileşimleri ile yönetilmektedir (Henderson ve ark 1991, Koyama ve ark 2001). Mitokondri membran geçirgenliğindeki bu dengesizlik, sitokrom c'nin sitoplazmaya geçişine neden olarak apoptotik süreci geri dönüşümsüz olabilecek devreye iter ve hücrenin ölümden kaçışını da olanaksız hale getirir (Boya ve ark 2004).

Sağlıklı hücrelerde mitokondrilerin dış membranındaki Bcl-2 proteini Apaf-1 protein molekülüne bağlı olarak bulunur (Ferri ve Kroemer 2001, Liston ve ark 2003). Hücre DNA'sında oluşan hasar Bcl-2 proteininin Apaf-1 molekülünden ayrılmasına neden olur (Henderson ve ark 1991). Böylece denge proapoptotik proteinlerin yönünde bozulur ve söz konusu proteinler mitokondrinin dış zarında porlar oluşturarak intermembranal boşluktaki proteinlerin sitoplazmaya kolayca geçişini sağlar (Cummings ve ark 1997, Ferri ve Kroemer 2001). Bu proteinlerden en önemlisi sitokrom c'dir (Gewies 2003). Sitokrom c sitoplazmada monomerik Apaf-1 ile birleşerek bu proteinin yapısında değişikliğe yol açar ve bu bileşen ATP varlığında inaktif durumdaki kaspaz-9 enzimine bağlanır ve "apoptozom" adındaki kompleks bir yapıya dönüşür (Thornberry ve Lazebnik 1998, Koyama ve ark 2001). Apoptozom da prokaspaz-9'u proteolitik özellikteki aktif kaspaz-9'a dönüştürür (Cummings ve ark 1997, Green ve Kroemer 1998). Aktif kaspaz-9 da kaspaz ailesindeki diğer inaktif kaspazları aktive eder (Henderson ve ark 1991, Thornberry ve Lazebnik 1998). Bu kaspazlardan en önemlileri kaspaz-3 ve kaspaz-7'dir (Green ve Kroemer 1998, Liston ve ark 2003). Bu enzimler hücredeki birçok yapıyı enzimatik olarak tahrip ederler ve apoptozisin sonlanmasında kilit rol üstlenirler (Cummings ve ark 1997, Green 2005). Bu reaksiyonlar kompleman veya pıhtılaşma mekanizmalarındakine benzer

bir biçimde zincirleme reaksiyonlar şeklinde oluşur ve sitoplazmadaki yapısal proteinlerin sindirimine, kromozomal DNA'nın parçalanmasına, hücrenin fagosite edilmesine yol açarlar (Green ve Kroemer 1998). Apoptozisin ilerlemesindeki bir diğer kritik aşama da normalde sitoplazmada bulunan apoptozis inhibitörlerinin (XIAP, c-IAP1, c-IAP2, ML-IAP/livin, ILP2, NAIP, Bruce/Apollon ve survivin) inaktifleştirilmesidir (Green 2005). Bu inaktifleştirme süreci mitokondri intermembranal boşluktan salınan SMAC/DIABLO ve OMI/HTRA2 gibi proteinlerce gerçekleştirilir (Cummings ve ark 1997, Ozansoy ve Başak 2002, Green 2005).

İçsel yolun temel bileşenleri (Basitten komplekse kadar) tüm ökaryotik türlerde korunur (Liston ve ark 2003). Sonuç olarak hem içsel hem de dışsal yollarla gelişen apoptozis, novoprotein sentezi eksikliğinde çok hızlı bir şekilde indüklenir (Cummings ve ark 1997, Ferri ve Kroemer 2001). Bazı virüsler apoptozisi dışsal yolla indükledikleri bildirilse de, çoğunun temelde kullandığı mekanizma içsel yoldur (Koyama ve ark 2003).

1.5.3.2. Dışsal yol ile apoptozis mekanizması

Fas, TNF reseptörleri (TRAIL-R1, TRAIL-R2, TNF-R1), DR3 ve DR6 hücre membranında bulunan integral proteinlerdir (Enari ve ark 1995). Reseptör kısımları hücre yüzeyinde bulunur (Green 2005, Elmore 2007). Bu reseptörlere FasL (CD95), TNF- α ve β gibi ölüm aktivatörlerinin bağlanması ile hücre zarında reseptör kompleksi oluşur (Enari ve ark 1995). Bu reseptörler sitoplazmaya apoptotik sinyalleri iletirler. Oluşan reseptör kompleksinin hücre içindeki uzantıları olan FADD, TRADD, prokaspaz-8 ve prokaspaz-2 gibi molekülleri bağlar ve oluşan yapı [DISC (Ölüme neden olan sinyal kompleksi)] kaspaz-8'i aktive eder (Cummings ve ark 1997, Thornberry ve Lazebnik 1998, Gewies 2003). Kaspaz-8, kaspaz-9'a benzer bir mekanizma ile diğer kaspazları aktive eder ve sonuçta hücrenin ölümü ve fagositozu gerçekleşir (Enari ve ark 1995). Örneğin, sitotoksik T-lenfositler ve doğal katil hücreleri virüs ile enfekte olmuş hücrelerin apoptotik ölümünü Fas reseptörlerin uyarımı aracılığı ile gerçekleştirir (Erdoğan ve Uzaslan 2003, Gewies 2003). Görüldüğü üzere apoptozisin içsel ve dışsal yolları mitokondri noktasında kesişmektedir ve apoptozisin bundan sonraki aşamaları, kaspazların aktivasyonu gibi, her iki yolda da ortaktır (Lagunoff ve Carrol 2003, Green 2005).

1.5.3.3. Endoplazmik retikulum stres yolu

Endoplazmik retikulumda (ER) viral protein moleküllerinin yoğun birikimi ER'nin kıvrımlarının açılmasına yol açarak, enfekte hücrelerin ER aracılı stres yolu ile apoptozisine neden olabilmektedir (Ferri ve Kroemer 2001). ER'den salınan Ca^{+2} ile beraber hücre içindeki Ca^{+2} miktarı artar ve Ca^{+2} DNA'nın nükleozomlar arası bölgelerden düzenli bir şekilde kırılmasında rol oynayan endonükleaz, transglutaminaz gibi enzimleri de aktive eder (Cummings ve ark 1997, Everett ve Mc Fadden 1999, Mason 1999). Sonuç olarak, enfekte hücrelerde viral proteinlerin kontrolsüz sentezi, bu ER stres yolunun bazı virüs ilişkili apoptozis tiplerinde önemli bir role sahip olabileceğini göstermektedir (Everett ve Mc Fadden 1999, Mason 1999).

Çizelge 5. Apoptozisin oluşumunda üç ana yol.

Yollar	Karmaşık Komponentler
Mitokondriye bağımlı yol (İçsel yol)	“Bax-Bak” in oligomerizasyonu/ Mitokondriden salınan sitokrom C/ Apoptozom formasyonu (Apaf-1+ prokaspaz 9)/ kaspaz 9 un aktivasyonu
Ölüm reseptör aracılı yol (Dışsal yol)	TNF/TNFR bağlanması/DISC formasyonu (Ölüme neden olan sinyal kompleksi)/Kaspaz-8,-10 aktivasyonu
ER stres aracılı yol	ER' deki viral glikoproteinlerin aşırı birikimi

DISC: Ölüme neden olan sinyal kompleksi ER: Endoplazmik retikulum

(Koyama ve Adachi 1997, Koyama ve ark 1998)

1.5.4. Apoptozisin Tanısı

1972 yılında ilk kez kullanılan apoptozis terimi hücrede meydana gelen morfolojik değişiklikleri ifade etmekteydi (Gewies 2003, Koyama ve ark 2003, Elmore 2007). Başlangıçta morfolojik kriterlere göre tanımlanan apoptozis, 80'li yılların sonuna doğru apoptotik hücrelerde düzenli DNA kırılmalarının oluştuğunun belirlenmesiyle TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt)-mediated dUTP- biotin nick end-labeling) yöntemi gibi moleküler biyolojik yöntemler geliştirilmiştir (Sgonc ve Wick 1994). Bunun yanında apoptotik süreçte görevli birçok biyokimyasal maddenin (Kaspazlar ve Bcl-2 ailesi

üyeleri vb.) belirlenmesiyle de apoptozisin tanısındaki yöntem çeşitleri daha da artmıştır (Henderson ve ark 1991). Histolojik ve elektronmikroskopik morfolojik değerlendirmeler apoptozisin tanısına yardımcı olmasına karşın, günümüzde artık moleküler yöntemler ya da apoptotik belirteçlerin belirlenmesiyle birlikte apoptozis tanısı kesinleştirilmelidir (Mangan ve ark 1996, Gewies 2003, Elmore 2007).

1.5.5. Viral Hastalıkların Patogenezisinde Apoptozis

Apoptozisin, çok hücreli canlılarda viral enfeksiyonlara karşı önemli bir savunma mekanizması olarak işlev gördüğü belirlenmiştir (Carson ve Riberio 1993, Irie ve ark 1998, Behnia ve ark 2000, Benedict ve ark 2002). Enfekte konak hücrelerinin apoptozis yolu ile yıkımlanmaları sonucu viral replikasyon gerçekleşemez ve bu sayede konakçının savunma sistemi virüs enfeksiyonu üzerinde yok edici bir etki oluşturur (Clem ve Miller 1993, Pidler ve ark 1984, Benedict ve ark 2002, Koyama ve ark 2003). Ancak, çoğu virüs konakçı hücre apoptozisine engel olmak için çeşitli stratejiler geliştirmişlerdir (Carson ve Riberio 1993, Irie ve ark 1998). Bunun yanında nekrozun apoptozise eşlik ettiği ve virüse karşı konak savunmasında apoptozise katkı sağladığı vurgulanmaktadır (Behnia ve ark 2000, Koyama ve ark 2003).

Apoptozisin indüksiyonu ve viral replikasyonun baskılanması arasında güçlü bir ilişki vardır (Clem ve Miller 1993, Irie ve ark 1998, Behnia ve ark 2000, Benedict ve ark 2002). Tek başına apoptozis ile viral replikasyon gelişiminin engellenebileceği belirtilmektedir (Clem ve Miller 1994, Irie ve ark 1998). Apoptotik yollar içerisinde pekçok faktör, enfekte hücrelerde antiviral reaksiyondan sorumluyken aynı zamanda makromolekül sentez regulasyonunda da görevlidir (Alcami ve Koszinowski 2000, Benedict ve ark 2002). Bunlardan virüse ait antiapoptotik gen ürünleri, apoptozisi engelleyerek virüs çoğalmasına olanak sağlarlar (Clem ve Miller 1994, Alcamı ve Koszinowski 2000, Benedict ve ark 2002). Herpes simpleks virüs (HSV-1/DNA virüs), Veziküler stomatitis virüs (VSV/RNA virüs) ve poliovirüs (RNA virüs) ile yapılan invitro çalışmalarda; apoptozisi indükleyici özelliğe sahip sorbitol varlığında bile, bu virüslerin antiapoptotik genleri sayesinde apoptozisi baskılayarak viral çoğalmayı gerçekleştirebildikleri görülmüştür (Clem ve Miller 1993, Koyama ve Miwa 1997, Koyama ve ark 1998, Koyama ve ark 2001). Bu çalışmalar

viral hastalıkların patogenezisinde apoptozisin önemli bir yere sahip olduğunu ortaya koymuştur (Clem ve Miller 1993, Pidler ve ark 1984, Koyama ve ark 2003).

1.5.6. Virüslerin Neden Olduğu Apoptozisin Sınıflandırılması

Apoptozis, enfekte hücrelerin viral etkenlere karşı geliştirdiği bir çeşit savunma mekanizmasıdır (Clem ve Miller 1994, Irie ve ark 1998, Benedict ve ark 2002). Evrim sürecinde virüsler, kendi çoğalmalarını önlemek üzere enfekte hücrelerin apoptozisle erken ölümüne karşı koyabilmek için birtakım yollar geliştirmişlerdir (Carson ve Riberio 1993, Clem ve Miller 1993, Irie ve ark 1998). Virüslerin konakçı hücrenin apoptozisinden kurtulmak için kullandığı stratejiler üç tipte sınıflandırılmıştır (Çizelge 6) (Koyama ve ark 2000).

Çizelge 6. Virüslerin apoptozis ile erken konakçı hücre ölümünün üstesinden gelmede uyguladığı stratejiler.

Stratejiler	Örnekler
Tip 1. Apoptozis indüklenmeden önce hızlı çoğalmayla yeni nesil virüslerin oluşumunu tamamlamak	VSV NDV, Influenza virus Poxviruslar Herpesvirüsler
Tip 2. Antiapoptotik genlerin apoptozis sürecini baskılaması	Adenovirüsler Poliovirüs HIV Sendaivirüs Papovavirüs (HPV, SV40)
Tip 3. Gizli enfeksiyon; enfekte hücrelerde apoptozisin indüklenmesi için gerekli sinyal yolu aktive edilmez	Persiste enfeksiyona neden olan virüsler

(Irie ve ark 1998, Koyama ve Adachi 1997, Koyama ve ark 1998, Benedict ve ark 2002)

Virüs ilişkili apoptozis süreçleri hakkında kısıtlı bilgiler olmasına karşın, virüs enfekte hücrelerde, apoptozisin indüklenme zamanı ile viral replikasyon siklusu arasında 4 farklı tipte ilişki belirlenmiştir (Çizelge 7) (Clem ve Miller 1993, Koyama ve Adachi 1997, Koyama ve ark 1998). Bu dört sınıflandırmanın üçünde (Tip-1, 2, 3) apoptozisin indüklenmesi enfekte hücrelerde gerçekleşir. Tip-1 ve 2'de enfekte hücrelerde yeni gen ekspresyonlarını gerektirmesine karşın, tip-3'de gerekli değildir (Koyama ve ark 2003, Elmore

2007). Tip-3'te; konakçı hücrenin apoptozisi için replikasyon yeteneği sınırlı olan viral ajanlar, protein sentezi (Cycloheximide) ve protein transkripsiyonu (Aktinomisin D) inhibitörlerinin varlığında apoptozisi indüklerler (Clem ve Miller 1994). Buna en iyi örnek, herpes simpleks virüs (Tip-1, tip-2) ve veziküler stomatitis virüs enfeksiyonlarıdır (Koyama ve Adachi 1997, Koyama ve ark 1998, Benedict ve ark 2002). Benzer durum, spesifik genetik mutasyonlar ya da ultraviyole ışınlarla tedavide de dikkati çeker. Tip-3'te; apoptozisin, virionların hücre yüzey reseptörlerine bağlanması ya da bunu takiben virüslerin hücreye girmesiyle başladığı düşünülmektedir (Koyama ve ark 2003).

Çizelge 7. Virüs enfekte hücrelerde, apoptozisin indüklenme zamanı ile viral replikasyon siklusu arasındaki ilişkiler.

Apoptozis	Apoptozise uğrayan hücreler	Viral replikasyona olan gereksinim	Virüs replikasyon siklusunda indüklenme zamanı	Örnekler
Tip 1	Enfekte hücreler	+	Virüs çoğalmasıyla eş zamanlı	Parvovirus B19 VSV NDV MV Influenza virus Reovirus TGEV Tavuk anemi virüs Sindbis virus La Crosse virus
Tip 2	Enfekte hücreler	+	Virüs replikasyonunun tamamlanmasından çok sonra (Nonspesifik dejenerasyon)	Mutant VSV
Tip 3	Enfekte hücreler	-	Replikasyonsuz	Vaccinia virus Reovirus HSV-1, HSV-2 VSV
Tip 4	Enfekte/Enfekte olmayan hücreler	-	Ek uyarımla ya da uyarımsız	HIV-1

TGEV: Transmissible gastroenteritis coronavirus

HSV: Herpes simplex virus

MV: Measles virüs

VSV: Veziküler stomatitis virüs

NDV: Newcastle disease virus

HIV-1: Human immunodeficiency virus tip 1

(Clem ve Miller 1994, Koyama ve Adachi 1997, Koyama ve ark 1998, Elmore 2007)

Çoğu RNA hayvan virüsleri enfekte hücrelerde Tip-1 apoptozise neden olur (Carson ve Riberio 1993, Irie ve ark 1998, Benedict ve ark 2002). Bu virüsler konakçı hücreye kendi viral proteinlerinin sentezini yaptırırken hücrenin ihtiyacı olan makromoleküler protein sentezini de engellerler (Clem ve Miller 1994). Belirtilen bu bozukluk, büyük olasılıkla içsel yol ile enfekte hücrelerin apoptozisine yol açar (Irie ve ark 1998). Ayrıca, konakçı hücrede virüs ilişkili genlerin oluşumu da gerçekleşir (Benedict ve ark 2002). İnterferon regulatory faktör (IRF-3) gibi gen ürünlerinden bazıları apoptozis oluşturabilir (Heylbroeck ve ark 2000). Bununla birlikte, viral proteinlerin fazla salınımı ER’de kıvrımların açılmasına yol açarak, enfekte hücrelerin ER aracılı stres yolu ile apoptozisi oluşturmaktadır (Everett ve McFadden 1999, Ferri ve Kroemer 2001).

Buna karşın bazı virüsler bilinen bir tetikleyici olmadan da apoptozisi Tip-2 yolla indükleyebilirler ve replikasyon sırasında apoptozis oluşmaz (Carson ve Riberio 1993). M protein (Matrix protein) taşıyan mutant VSV suşu ile enfeksiyon sırasında gözlenen apoptozis bu tip içerisinde değerlendirilir (Kopecky ve ark 2001). M proteinin apoptozisten sorumlu olduğu düşünülür, çünkü hücre kültürlerinde yalnızca M protein salınımı apoptozise neden olduğu görülmüştür (Koyama ve ark 2003). Buna karşın yapısal değişikliğe uğramış M protein taşıyan VSV’nin diğer bir mutant suşunun, ancak viral replikasyondan uzun süre sonra apoptozise yol açtığı belirlenmiştir (Kopecky ve ark 2001). Bu olguda apoptozisin, M proteinin direkt etkisinden ziyade, enfeksiyondan uzun süre sonra enfekte hücrelerdeki nonspesifik dejenerasyonunun bir sonucu olarak oluştuğuna yorumlanmıştır (Koyama ve ark 2003).

Tip-4 apoptozisin, viral partiküller ile hücre reseptörlerinin etkileşimleri ya da enfekte hücrelerden salınan viral proteinler aracılığıyla oluştuğu düşünülür (Irie ve ark 1998). Bu etkileşim, hücrelerin enfekte olup olmamasına bağlı olmaksızın hücrelerde direkt olarak apoptozis yollarının indüklenmesine neden olur (Ameisen ve Capron 1991). Bu şekildeki apoptozis ilk olarak insanlarda Human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) enfeksiyonunda CD4⁺ T-lenfositlerin yaygın ölümünde belirlenmiştir (Ameisen ve Capron 1991; Meyaard ve ark 1994, Fukumori ve ark 1998, Koyama ve ark 2003). Ancak Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) hastalığında olduğu gibi diğer retrovirüsler de

apoptozis konakçı savunmasının aleyhine çalışarak enfeksiyonun şiddetini daha da arttırmaktadırlar (Ameisen ve Capron 1991, Fukumori ve ark 1998).

AIDS ve Feline immunodeficiency virus (FIV) CD4⁺ T-lenfositlerin progresiv ve selektif azalmasıyla karakterize hastalıklardır (Ameisen ve Capron 1991, Fukumori ve ark 1998, Benedict ve ark 2002, Elmore 2007). İmmun hücreleri öldüren bu virüslerin patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır (Fukumori ve ark 1998). HIV enfeksiyonu sırasında ölen çoğu T-lenfosit hücrelerinin virüsle enfekte olduğu görülmemiştir ve bu yüzden apoptotik T-lenfosit hücre sayısı virüsün direkt etkisiyle ilişkilendirilmez (Ameisen ve Capron 1991, Meyaard ve ark 1994, Fukumori ve ark 1998). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda HIV virüsünün CD4⁺ T-lenfositleri enfekte ettiği ve yüksek ölüm oranına ulaşan bu hücrelerin kandaki sayılarının azaldığı düşünülmekteydi (Cohen ve ark 1992). Fakat son araştırmalar bu görüşü desteklememektedir. İnsan kanındaki CD4⁺ T-lenfositlerin sadece 1/100.000'inin virüs ile enfekte olduğu saptanmıştır (Cohen 1998). Bu durumda enfekte olmamış çok sayıdaki CD4⁺ T-lenfositlerin neden öldüğü sorusu gündeme gelmektedir. Mekanizma tam olarak halen anlaşılacakla birlikte, araştırmalar bu olayda apoptozisin rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır (Fukumori ve ark 1998). Bütün CD4⁺ T-lenfositler (Enfekte olan ve olmayan) Fas reseptörleri eksprese ederler (Enari ve ark 1995, Ferri ve Kroemer 2001, Erdoğan ve Uzaslan 2003). HIV'in Nef adındaki geninin ekspresyonu HIV ile enfekte hücrelerde Fas Ligand molekülünün hücre yüzeyinde çok miktarda eksprese edilmesine sebep olur (MeYaard ve ark 1994, Fukumori ve ark 1998). Enfekte CD4⁺ T-lenfositlerin FasL'leri, enfekte olmayanların Fas reseptörleriyle birleşerek, sağlıklı CD4⁺ T-lenfositlerin apoptozisinin indüklenmesine neden olurlar (Enari ve ark 1995). Sonuç olarak, apoptozis burada organizmanın yararına değil, tam aksine zararına çalışmaktadır ve hastalığın seyrini olumsuz şekilde etkilemektedir (Cohen 1998).

Apoptozisin organizmanın yararına olan bir savunma mekanizması olarak çalışmadığı diğer bir hastalık da, HSV-1'in hepatositlerde şiddetli apoptozise neden olarak hepatitise neden olmasıdır (Irie ve ark 1998, Benedict ve ark 2002). Bunun yanında paramikrovirüs ailesinde yer alan hastalıkların (Sığır vebası, küçük ruminanat vebası, distemper hastalığı ve kızamık) çoğunda özellikle lenfoid dokularda ve periferal kandaki lenfositler ve makrofajlarda nekrozla birlikte apoptozisin indüklenmesiyle immün sistemin çöktüğü görülür (Cohen ve ark 1992). Benzer durum, parvovirüs enfeksiyonlarında da dikkati çeker (Carson ve Ribeiro 1993).

1.5.6.1. Hızlı çoğalmayla apoptozisten kaçış

Çoğu RNA virüsleri apoptotik koşullar altında da gelişimini devam ettirebilmeleri, yukarıda değinilen bir konakçı savunma mekanizması olarak apoptozisin rolü tartışmalı bir konuma sokar (Benedict ve ark 2002). RNA virüs enfeksiyonlarında apoptozisin önemini ortaya koymak için; veziküler stomatitis virüsü ile enfekte HeLa hücre kültürlerinde, viral replikasyon titresi ve apoptotik süreç karşılaştırılmıştır (Koyama 1995, Lagunoff ve Carrol 2003). VSV virüsü, replikasyonu sırasında (İlk 5 saat içerisinde) enfekte hücrelerin çoğunun apoptotik ölümüne yol açmıştır (Koyama 1995). Bu deneyde, yeni nesil virüs oluşumunun gerçekleştiği ilk 5 saatte viral çoğalma ile apoptozis kinteği arasında paralellik belirlenmiştir. Sekiz-10 saat içerisinde ise viral replikasyon kinetiği apoptozise göre giderek artan bir grafik göstermiştir. Böylece VSV'ye dayalı enfeksiyonda apoptozis indüklenmiş olmasına karşın, virüs hücrede replikasyon hızını arttırarak apoptozisin önüne geçmiştir (Koyama ve ark 2003, Lagunoff ve Carrol 2003). Benzer sonuçlar influenza virüsü ile yapılan çalışmalarda da kaydedilmiştir (Kurokawa ve ark 1999). Bir bütün olarak düşünüldüğünde, apoptozisin bazı RNA virüslerinin ilk nesil formasyonu için baskılayıcı bir role sahip olmasına rağmen, sonraki nesil virüsler bu baskının üstesinden gelmek için hızlı çoğalma yolunu keşfetmişlerdir (Koyama ve ark 2003).

1.5.6.2. Antiapoptotik genlerle apoptozisten kaçış

DNA virüsleri apoptozisten kurtulmak için RNA'lı virüslerden daha farklı bir yol izler (Clem ve Miller 1994, Elmore 2007). Yukarıda bahsedilen RNA virüslerden farklı olarak, çoğu DNA virüsü (poxvirüsler, herpesvirüsler ve adenovirüsler) enfekte ettiği hücrelerin apoptozisine sınırlı düzeyde neden olur (Cuconati ve White 2002). Buna neden olarak, bu grup virüslerin konakçı hücrenin apoptozisine karşı geliştirdikleri antiapoptotik genler gösterilmektedir (Cuconati ve White 2002).

Enfekte hücreler, enfeksiyöz etkenlerin sitotoksik T-lenfositlerce tanımlanmasını ve öldürülmesini sağlamak amacıyla, major histocompatibility class I (MHC-I) yüzey reseptörleri aracılığıyla viral peptidleri sunarlar (Clem ve Miller 1994). Sitotoksik T-lenfositler de, hedef hücrelerde apoptozisi indüklemek için, perforin kullanarak proteazları aktive ederler ya da hedef hücre yüzeyinde Fas reseptörlerinin aktivasyonunu gerçekleştirirler

(Enari ve ark 1995, Elmore 2007). Birçok virüs konakçı savunmasını altüst edebilmek amacıyla, enfekte ettiği hücrelerde apoptozisin normal düzenini bozabilmektedirler (Cuconati ve White 2002). Bu amaca ulaşmak için virüsler, önemli inhibitör proteinleri kodlayan antiapoptotik genleri ile apoptozise giden iki ana kontrol noktasından birini bloke ederek apoptozisi engellerler (Cuconati ve White 2002).

Cowpoxvirus antiapoptotik geni crmA, spesifik olarak kaspaz-1 ve kaspaz-8'i bloke eder ve Fas/FasL aracılı apoptotik hücre ölümünü engeller (Ray ve ark 1992; Gagliardini ve ark 1994; Enari ve ark 1995, Los ve ark 1995). Diğer antiapoptotik viral genler Bcl-2'yle yapısal ve fonksiyonel benzerlikte bir protein kodlar (Henderson ve ark 1991, Cuconati ve White 2002). Örneğin, Epstein-Barr virüsün BHRF-1, Afrika domuz vebası virüsünün LMW5-HL, ve adenovirüsün E1B antiapoptotik genleri Bcl-2 benzeri proteinleri kodlar (Rao ve ark 1992; Henderson ve ark 1991, Reed ve ark 1994). Epstein-Barr virüsünden latent membran protein-1 (LMP-1) gibi bazı viral gen ürünleri virüsün konakçı hücrede varlığını sürdürebilmesi için Bcl-2 proteinini düzenleyebilirler (Henderson ve ark 1991). Baculovirus'ta apoptozisin inhibitörü olan p35 geninin, enfekte hücrelerin ölümünü nasıl engellediği henüz açıklığa kavuşturulamamıştır (Clem ve Miller 1993). İlginç olan, diğer Baculovirus geninin (Apoptozis inhibitör geni, IAP) çocuklarda gözlenen resesif nörodejeneratif bir bozukluğun patogeneziyle ilişkili bir genle analog oluşudur (Roy ve ark 1995).

1.5.6.3 Persiste enfeksiyon ile apoptozisten kaçış

Persiste enfeksiyonun ya da çok yavaş seyirli viral enfeksiyonun oluşumu için, virüs konakçı hücrenin kritik fonksiyonlarını engellememelidir. Antiapoptotik genin diğer bir amacı da, persiste enfeksiyonun gelişmesine zemin hazırlamaktır (Benedict ve ark 2002). Bunun yanında, bu genlere sahip olmayan virüslerin neden olduğu enfeksiyonlarda, şayet konakçı hücrelerin apoptozisi tetiklenmezse persiste enfeksiyon oluşabilir. Bu tip enfeksiyonlar "kriptik enfeksiyon" olarak da tanımlanabilir (Koyama ve ark 2003).

Araştırmalar sendaivirüsün persiste enfeksiyon yoluyla replike olduğunu göstermektedirler (Koyama ve ark 2003). Doğal olgularda sendaivirüs sıklıkla persiste enfeksiyona neden olmakta, affinite duyduğu dokularda çok az sayıda hücre ölümüne yol açmaktadır-

lar. Hücre kültürlerinde de sendaivirüsün nadiren sitopatojenik etki oluşturarak üremesi bunu doğrulamaktadır. Buna karşın, paramikzovirüs ailesinin bir diğer üyesi Newcastle hastalığı virüsü ise gerek *invivo* ve gerekse *invitro* çalışmalarda, enfekte hücrelerde apoptozisi aktive ettikleri iyi bilinmektedir (Koyama ve ark 2003). Bu durum gurubun diğer üyeleri sığır vebası, küçük ruminant vebası ve distemper virüsleri için de farklı değildir (Koyama ve ark 2003). Gizli enfeksiyon hipotezi sendaivirüs ile yapılan çalışmalarla açıklanmaya çalışılmaktadır. Buna göre; virüsün salgıladığı antiapoptotik özellikteki C proteininin enfekte hücrelerde birden fazla fonksiyonu yerine getirdiği düşünülmektedir. Diğer antiapoptotik genlere ve antiapoptotik unsurlara göre C proteinin hedeflerinin daha farklı olduğu düşünülmektedir. C proteinin görevleri IFN'nin antiviral fonksiyonlarının baskılanması, viral RNA'nın sentezinin düzenlenmesi ve virionun oluşturulması şeklinde sıralanabilir. Büyük olasılıkla C proteinin yalnızca apoptozisi baskılamakla kalmayarak persiste enfeksiyona da zemin hazırladığı düşünülmektedir. Değinilen bu bilgilerin yeterli olmaması nedeniyle, viral hastalıkların patogenezesinde “persiste enfeksiyon” başlığı hala hipotez olma özelliğini korumaktadır (Koyama ve ark 2003).

Virüs ilişkili apoptozisin konakçı savunma mekanizmasındaki rolü, enfekte hücrelerin makrofajlarca tanınması ve sindirimini sağlayarak viral replikasyonu baskılamaktır (Ferri ve Kroemer 2001). Ancak, apoptozisin nekroza göre virüs spesifik immüitenin gelişiminde çok fazla etkili olmadığı belirtilmektedir (Koyama ve ark 2000). Hatta viral enfeksiyonlarda immunité üzerine yapılan çalışmalar, apoptozisin immün cevap üzerinde negatif etkiye sahip olabileceğini göstermektedir (Clem ve Miller 1993). Yangısal reaksiyonlar yalnızca apoptotik hücrelerin fagositozu ile tetikleniyorsa otoimmün hastalıklar düşünülmelidir (Meyaard ve ark 1994). Ardışık immünolojik reaksiyonlar, makrofajların antijen sunumunu ve çeşitli sitokinleri gerektirir. Apoptotik hücreler nekrotik hücrelerin aksine sitokin oluşumuna neden olmazlar. Ancak, bazı durumlarda apoptotik hücreler yangısal reaksiyonda başlangıç için gerekli sitokinleri sağlayabildiği ve virüs spesifik immüitenin gelişimine kısmen de olsa katkıda bulunabileceği kaydedilmektedir. Viral enfeksiyonlarda, immün yanıtın şiddetini apoptozisten ziyade nekrozun derecesi belirlemektedir (Koyama ve ark 2003).

Virüs ilişkili apoptozisin önemi hem virüsün tipine hem de hücrenin tipine bağlıdır (Clem ve Miller 1993). *In vitro* çalışmalarda virüs ilişkili apoptozis enfekte hücrede viral

replikasyonu ve salınımı engelleyerek konakçı savunma mekanizmasına önemli katkı sağlar (Clem ve Miller 1993). Ancak FIV, HIV gibi enfeksiyonlarda ise apoptozis immun sistem hücrelerinde yıkıcı etkisine bağlı olarak immun sistemi felce uğratarak hastalığın başlamasını tetikleyebilir (Meyaard ve ark 1994). İmmun sistemde apoptozisin supresif rolü göz önüne alınırsa apoptozisin yerine nekrotik hücrelerin bulunması merak uyandırmaktadır, ilgi çekmektedir (Benedict ve ark 2002). Enfeksiyon alanında güçlü nekroz kapsamlı yangısal reaksiyon başlatmasına rağmen bu durum nekrozun virüs spesifik immunitesinin indüklenmesinde önemli biyolojik rol oynadığını akla getirmektedir (Meyaard ve ark 1994). Apoptozis ve nekrozun dengesi enfekte hayvanlar için gereklidir. İn vivo konakvirüs interaksiyonlarında ilerleyen çalışmalar viral enfeksiyona erken kalıtsal cevapta apoptozis ve nekrozun önemi ve bu reaksiyonlara olan ihtiyaç anlaşılmalıdır (Koyama ve ark 2003).

1.5.6.4. Antiapoptotik aktiviteli RNA virüsler

RNA virüslerin, konakçı hücrenin apoptotik cevabına karşı çizdiği tek stratejik yol hızlı replikasyon olduğu yukarıda belirtilmişti. Bu yolla, enfekte hücreler apoptozise uğramadan önce yeterli titrede yeni nesil virüs oluşumu gerçekleşmektedir (Koyama ve ark 1998, Koyama ve ark 2000, Benedict ve ark 2002). Bunun yanında, bu grup virüslerin birçoğunun konakçı hücre çekirdeğinden kısmen bağımsız şekilde sitoplazmada üreme göstermesi çoğalma hızını daha da arttırmaktadır (Aubert ve Blaho 2001). RNA virüslerin çoğunun evrimsel süreçte antiapoptotik genlere sahip olmaya çalışmaktansa, hızlı çoğalma yolunu seçerek apoptozisten kurtuldukları anlaşılmaktadır. Buna karşın, apoptozisi engelleyen birkaç RNA virüsten biri olan retrovirüs ailesi üyesi HIV-1'in antiapoptotik *upr* geni sorbitol varlığında bile HEp-2 hücrelerinde apoptozisi baskıladığı dikkati çekmiştir (Fukumori ve ark 1998). HIV-1 virüsü konakçı hücreye girdiğinde ters transkripsiyon, konakçı hücre DNA'sına integrasyon ve virüs genomunun ekspresyonu için uzun bir süreye gereksinim duyduğundan çoğalma hızı yavaştır. Bu nedenlerden dolayı, HIV-1'in apoptozisin yıkımlayıcı etkisinden kurtulmak için, DNA virüslerinde olduğu gibi antiapoptotik genler geliştirmiş olması doğal olarak karşılanır (Meyaard ve ark 1994, Benedict ve ark 2002, Koyama ve ark 2003).

Pikornavirüs ailesinin üyesi olan küçük RNA genomlu poliovirüs, çok hızlı çoğalma yeteneğine sahip olmasına karşın antiapoptotik genlere de sahiptir (Tolskaya ve ark 1995). Enfeksiyon sırasında sorbitolle muamele edilen hücrelerde poliovirüslerin antiapoptotik aktivitesi saptanmıştır. Poliovirüsler geçici olarak enfekte hücrelerde yalnızca apoptozisi değil aynı zamanda nekrozu da baskırlar. Poliovirüsler kısa sürede ve etkili bir şekilde enfekte hücrelerde nekrozun bir işareti olan sitopatojenik etkilere yol açarlar. Virüsün kendi çoğalması ve ihtiyaç duyduğu yeterli zamanı sitopatojenik etki başlamadan önce sağlayabilmesi için, hem nekrotik hem de apoptotik hücre ölümünü baskılaması gereklidir (Koyama ve ark 2001).

Paramikzovirüs ailesinin bir üyesi olan sendaivirüs de antiapoptotik yeteneğe sahiptir. Poliovirüsün aksine sendaivirüs persiste enfeksiyona neden olur ve çok yavaş çoğalır. Poliovirüs HEp-2 hücrelerinde viral replikasyonunun tek siklusunu 8 saatte tamamlarken, sendaivirüs bu siklusu yaklaşık 40 saatte tamamlar. Saha suşu sendaivirüs'ün HEp-2 hücrelerinde apoptozisi indüklememelerine karşın, C proteinlerinden yoksun bir mutant sendaivirüs enfeksiyonu viral replikasyon kaybıyla beraber şiddetli apoptozise neden olur. Bu sonuçlar, virüsün sahip olduğu C proteininin HEp-2 hücrelerinde apoptozisi baskılayarak viral replikasyon artışına olanak sağladığını gösterir (Koyama ve ark 2003).

1.5.7. Herpesvirüsler ve Apoptozis

1.5.7.1. Herpesvirüslerin U_s3 antiapoptozis geni

Herpes simpleks virüs-1 (HSV-1)'le doğal enfeksiyon sürecinde apoptozis görülmez (Koyama ve Miwa 1997, Aubert ve Blaho 2001, Benedict ve ark 2002). Ancak, invitro çalışmalarda sikloheksimid varlığındaki HSV-1 enfekte hücrelerin apoptozisi kaydadeğerdir (Koyama ve Miwa 1997). HSV'nin antiapoptotik aktivitelerinin gösterilmesi için yapılan bir çalışmada, ortamda 1 M sorbitol bulunan kültürlerde hem HSV-1 hem de HSV-1 sahte enfekte HEp-2 hücrelerde; HSV-1 ile enfekte hücrelerde sorbitol miktarının indüklediği apoptozisin zamanla azaldığı belirlenmiş, ancak sahte enfekte hücrelerde ise apoptozis devamlılığını korumuştur (Koyama ve Miwa 1997). Bu da, HSV-1 genomunun antiapoptotik gen içerdiğinin en büyük kanıtı olarak değerlendirilmiştir (Koyama ve Miwa 1997, Aubert ve Blaho 2001). Daha sonra, HSV-1 antiapoptozis geni ayrıntılı olarak ta-

nımlanmış ve U_s3 protein kinaz geni olarak adlandırılmıştır (Aubert ve Blaho 2001, Cuconati ve White 2002). Bu gen, Bcl-2 protein ailesinden proapoptotik Bad'ın aktif hale gelmesini önleyerek apoptozisi engellemektedir (Henderson ve ark 1991, Rao ve ark 1992, Nagata 1997, Cuconati ve White 2002). Bununla birlikte U_s3 geni taşıyan HSV-2'nin enfekte hücrelerde apoptozise engel olması gerekirken, sikloheksimid varlığında apoptozis şekillendiği kaydedilmiştir. HSV-1 virüsünde U_s3'e benzer fonksiyonda apoptozisi baskılayıcı birkaç gen daha bulunmuştur (Rao ve ark 1992, Aubert ve Blaho 2001). Bu sonuçtan virüslerin enfekte hücrelerin apoptozisine karşı koyabilmeleri için multiple antiapoptotik genlere gereksinimi olduğu çıkarılmıştır (Aubert ve Blaho 2001). Yalnızca bir antiapoptotik genin çok fazla etki gösteremeyeceği düşünülmektedir. Keza, çoğu DNA virüsünün viral enfeksiyona karşı hücrenin önemli bir savunma mekanizması olan apoptozisi durdurmak için birden fazla gen içermeleri, bu düşünceyi desteklemektedir (Koyama ve ark 2003).

1.5.8. Viral Hastalıklarda Nekroz ve Apoptozis

Ökaryotik hücreler nekroz ya da apoptozis ile ölüme giderler (Cohen ve ark 1992, Clem ve Miller 1993, Behnia ve ark 2000, Benedict ve ark 2002, Elmore 2007). Bu iki hücre ölüm şekli arasında, gerek morfolojik gerekse biyokimyasal ve fiziksel açıdan farklılıklar bulunmaktadır. Nekroz, bir dokuda patolojik bir reaksiyon sürecinde hücrelerin toplu olarak zedelenmesi sonucunda oluşur (Kerr ve Harmon 1991, Cohen ve ark 1992).

Hücre ölümünün bu şeklinde, plazma membran bütünlüğü bozulmakta ve pasif bir ölüm şekillenmektedir (Behnia ve ark 2000). Nekroz sonrasındaki hücre ölümü, rastlantısal hücre ölümü olarak da adlandırılmaktadır (Elmore 2007). Nekrozda, hücresel programların kontrolünde aksamalar vardır ve sonuçta hücre membranındaki defektler intraselüler içeriklerin ekstraselüler sıvıya geçişine izin verir (Cohen ve ark 1992).

Apoptozis, bugüne değin bildiğimiz hücre ölümü olan nekrozdan oldukça farklı bir süreçtir (Clem ve Miller 1994, Benedict ve ark 2002). Nekroz; akut hücre hasarını takiben, hücre ve organellerinin şişip lizise uğradığı pasif ve patolojik bir hücre ölümüdür (Kerr ve Harmon 1991). Nekroz, dışsal etkiler ile hücre savunma mekanizmalarının devreye girmesine fırsat vermeyecek şekilde gelişir (Cohen ve ark 1992). Nekrozda zarar gören asıl hedef

organel, hücrenin enerji kaynağı olan mitokondrilerdir (Elmore 2007). Nekrozda, hücrenin ve organellerinin su alarak patlaması ve hücre dışında birçok molekülün serbest kalması sonucunda yangısal yanıt gelişir (Benedict ve ark 2002). Apoptozis ise, nekrozdan farklı olarak enerji gerektiren genetik kontrollü bir süreçtir. Apoptozis sırasında, nekrozun aksine hücre büzülür ve bir saatten kısa bir sürede hacminin %30'unu kaybeder (Elmore 2007). Apoptotik hücrede mitokondri morfolojik olarak sağlamken, asıl hasar gören hedef organel hücre çekirdeğidir (Benedict ve ark 2002, Kültürsay ve Kayıkçıoğlu 2002).

Apoptozis nekrozdan farklı bir süreç olarak düşünülmesine karşın apoptozisin şiddetli şeklendiği durumlarda bile çok sayıda nekrotik hücre bulunabilmektedir (Benedict ve ark 2002). Bu da virüsün tetiklediği apoptotik stimulusların, enfekte hücrelerin bazılarında nekrotik yolla hücre ölümüne yol açtığını düşündürmektedir (Elmore 2007). Bu iki tipteki hücre ölüm oranı enfekte hücrelerin fizyolojik durumuna bağlıdır (Koyama ve ark 2003).

1.6. Çalışmanın Amacı

BHV-5 enfeksiyonlarının patogenezi üzerine çalışmalar yapılmış olup, halen tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir (Lee ve ark 1999, Vogel ve ark 2003). Hastalığa yönelik yapılmış olan araştırmalarda BHV-5'in MSS'de lokalizasyonu ve patolojik lezyonları iyi tanımlanmıştır (Belknap ve ark 1994, d'Offay 1995, Vogel ve ark 2003, Cardoso ve ark 2010a, Machado ve ark 2013). BHV-5 ile apoptozis arasındaki ilişkilere yönelik araştırmalara ise yalnızca hücre kültürlerinde gerçekleştirilen çalışmalarda değinilmiştir (Silva-Frade ve ark 2010, Xu ve ark 2012). Buna karşın deneysel ya da doğal enfekte hayvanlarda apoptozis ile virüs enfekte hücreler arasındaki ilişkiye yönelik herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır.

Sunulan tez çalışmasında, immunohistokimyasal yöntem ile tanısı gerçekleştirilmiş BHV-5 ile doğal enfekte buzağılarda MSS'de apoptozisin varlığı TUNEL yöntemle ve apoptotik yolaklar da aktif kaspaz-3, -8, -9 immun belirteçlerle saptanacaktır. Böylelikle, doğal immunitenin önemli bir parçası olan apoptozisin BHV-5 enfeksiyonunun patogeneziindeki rolü açıklığa kavuşturulmuş olacaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hayvan ve Doku

Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda, 2003-2010 yılları arasında rutin incelemeye alınmış BHV-5 enfeksiyonu şüpheli 21 adet buzağının sistemik nekropsileri gerçekleştirilmiş ve elde edilen materyaller tespit edilerek, rutin takip işlemleri sonunda parafinde bloklanıp arşivlenmiştir. Bu hayvanlara ait ırk, yaş, cinsiyet ve geldiği yer ile ilgili bilgiler laboratuvarında incelenme sırasına göre dizilip olgu numaraları oluşturularak Çizelge 8' de sunulmuştur.

Çalışma dizaynı, Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından, 2011 yılı VI. Oturumu ve B.30.2.ADÜ.0.00.00.00/050.04/2011/055 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

2.2. Histopatolojik İnceleme

Her bir hayvanın beyin (Serebrum, serebellum, beyin kökü ve medulla spinalis) dokularından alınan doku örnekleri 12-24 saat % 10'luk tamponlu formalin solüsyonunda tespit edildi. Trimleme işleminin ardından 6-8 saat süre ile akan çeşme suyu ile yıkandı, doku takip cihazında (Leica TP1020) bilinen yöntemlerle, alkol (70°, 80°, 90°, 96° ve 100°) ve ksilol serilerinde işlem gördükten sonra parafinde bloklandı. Bu bloklardan 5-7 µm kalınlığında normal ve Poly-L-lysin'li (Sigma-Aldrich) lamlara kesitler alındı (Mikrotom, Leica RM 2135). Normal lamlara alınan kesitler, hematoksilin ve eozin (HE) ve Luxol Fast Blue myelin boyası ile boyandı (Sheehan ve ark 1980, Culling ve ark 1985). Poly-L-lysin'li lamlara alınan kesitler ise immunohistokimyasal incelemeler için kullanıldı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus BX51) incelendi ve mikroskopik dijital fotoğraflar (Olympus C-5050) çekilerek bilgisayar ortamına aktarıldı.

2.3. İmmunohistokimyasal İnceleme

Viral antijenin dokularda immunohistokimyasal olarak gösterilmesi amacıyla, Avidin-Biotin Peroksidaz Kompleks (ABC) metot ilgili firmanın [Invitrogen® Histostain® Plus

Broad Spectrum Detection Kit, USA] önerdiği şekilde uygulandı. Testin her aşaması nemli kamarada gerçekleştirildi ve takipler arasında kesitler 3x5 dakika süreyle fosfat tamponlu solüsyonu (Phosphate buffer saline, PBS-pH 7,2) ile yıkandı. Parafin kesitler, ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek deparafinize ve rehidre edildi. Lamlar absolut metanolde hazırlanmış % 0,3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) ile 30 dakika süreyle inkübe edilerek dokuların endojen peroksidaz aktivitesi engellendi. Daha sonra, doku örnekleri % 0,1'lik proteaz K solüsyonunda nemli kamarada 37 °C'de 10 dakika bekletildi. Sonraki adımda PBS ile yıkanan kesitler dokuda viral antijenin belirlenmesi için 1/400 oranında sulandırılmış fare anti-BHV-5 monoklonal antikoru (VMRD, Inc. α -Bovine Herpesvirus-5 Mab Lot L6G1203) ile kaplandı ve +4 °C'de bir gece süreyle inkübe edildi. Benzer şekilde dokulara anti BHV-1 monoklonal antikoru (VMRD, Inc. α -Bovine Herpesvirus-1/IBR Mab Lot P120305-001) uygulandı. Aynı dokularda kaspaz aktivitesini belirlemek amacıyla seri halde alınmış kesitlerin diğer kopyaları sırasıyla ve birbirinden ayrı olarak 1/100 sulandırma ile mouse anti-caspase 3 (Santa Cruz Biotechnology[®] Inc, sc-56053), anti-caspase 8 (Santa Cruz Biotechnology[®] Inc, sc-5263), anti-caspase 9 (Santa Cruz Biotechnology[®] Inc, sc-56076) ve anti-Bcl 2 (Abcam) antikoları ile muamele edildi. Aynı şekilde tüm lamlar +4°C'de bir gece süreyle inkübe edildi. Bunu takiben tüm dokular, kullanıma hazır biyotinlenmiş sekonder antikor ile kaplandı ve oda ısısında 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra, kesitler horseradish streptavidin peroksidaz konjugatı ile oda ısısında 15 dakika süreyle inkübe edildi ve 3-5 dakika DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, Invitrogen[®] DAB plus Substrate Kit)-H₂O₂ substratı uygulandıktan sonra reaksiyon sulandırıldı. Harris hematoksilin ile karşıt boyama yapıldıktan sonra dokular alkol serilerinde dehidre edildi. Ksilolde şeffaflandırılan kesitler yapıştırıcı (Entellan-Merck) ile kapatıldı. Tüm kesitlerin aynı şartlarda ve prosedürde boyanmasından sonra, sonuçlar ve dokulardaki ekspresyon yoğunlukları ışık mikroskopunda semikantitatif olarak değerlendirildi.

Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP Nick End-Labeling (TUNEL) Assay

Apoptotik hücrelerde DNA kırılmalarının TUNEL yöntemle belirlenmesinde ticari kit kullanıldı (Millipore "ApopTag[®] Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit"). Özetle kesitler parafini giderildikten ve alkol serilerinden geçirildikten sonra PBS ile yıkılarak proteinaz K (20 µg/ml) ile oda ısısında 15 dakika inkübe edildi ve 2 kez 2'şer dakika distile suda yıkandı. Bunu takiben kesitler % 3'lük H₂O₂ solüsyonunda 5 dakika tutuldu ve

iki kez 5 dakika PBS ile yıkandı. Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) ve fluorescein-dUTP (29-deoxyuridine 59-triphosphate) içeren TUNEL reaksiyon karışımından 50'şer µl damlatılarak 37 °C'de 1 saat nemli kamerada inkube edildi. Reaksiyonun varlığı floresan mikroskopta onaylandıktan sonra, kitte yer alan ve 1/34 oranında distile su ile hazırlanmış solüsyon (Stop/Wash) ile 15 saniye çalkalanıp aynı solüsyonda 10 dakika oda sıcaklığında inkube edildi ve PBS (3x1 dakika) ile yıkandı. Takibinde anti-digoxigenin peroksidaz konjugat preparatların yüzeyine kaplandı ve oda sıcaklığında 30 dakika inkubasyona bırakıldı ve PBS (4x2 dakika) ile yıkandı. Son olarak %0,045 (v/v) H₂O₂ içeren % 0.08 (w/v) 3, 3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) solusyonunda 3-6 dakika arasında tutularak kromojenik reaksiyon gerçekleştirildi. Süre sonunda reaksiyonun varlığı ışık mikroskobunda onaylandıktan sonra, örnekler distile suda (3x1 dakika) yıkandı. Mayer hematoksilen ile hafif şekilde boyanan kesitler alkol serilerinde dehidre edildi ve lamelle kapatıldı. Negatif kontrol kesitler de aynı şekilde yürütüldü ancak TUNEL reaksiyon karşımı terminal transferazı içermemekte idi.

2.4. İmmunohistokimyasal Boyama Sonuçlarının Analizi

BHV-5 viral antijenin immunoreaktivitesi ve TUNEL reaksiyon sonuçları ile kaspaz belirteçlerinin immunoreaktiviteleri semikantitatif olarak değerlendirildi. Derecelendirilmede incelenen alanlardaki pozitif hücre ve alanlar baz alındı ve analiz için yüksek yoğunlukta reaksiyon belirlenen alan rastgele seçildi. Işık mikroskobunda her örnek için, toplam 20x'lik büyütmede her biri toplam 100 gritlik (10x10) ve toplamı 0,025 mm²'ye denk gelen 10 ayrı saha incelendi. Her sahadaki immunopozitif hücre verileri toplanarak ortalaması alındı ve o dokunun verisi olarak değerlendirildi. Doku kesitlerinde, viral antijen, apoptozis belirteçleri ve TUNEL immunohistokimyasal incelemeleri sonucunda alınan subjektif veriler sayısal verilere dönüştürülerek Microsoft Excel ile grafiklendirildi.

Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. MSS'de bölümler arasında (Serebral hemisfer, serebellum, beyin kökü, medulla spinalis) değişkenler açısından (TUNEL pozitif hücreler ve BHV-5 antijen pozitif hücreler) istatistiksel farklılıklar Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. p<0,05 anlamlı kabul edildi (Özdamar 2013).

MSS'nin her bir bölümde BHV-5 antijen pozitif ve TUNEL pozitif hücreler arasında fenotipik korelasyonların hesaplanmasında parametrik olmayan Spearman korelasyon analizi kullanılmış olup, tüm analizlerde SPSS 15.0 paket programından yararlanılmıştır. ($p < 0,05$ anlamlı kabul edildi).

Çizelge 8. Nekropsisi yapılan hayvanlara ait olgu numarası, ırk, yaş, cinsiyet ve geldiği yer ile ilgili bilgiler.

Olgu No	İrk	Yaş	Cinsiyet	Geldiği Yer	Canlı/ölu
1	Holstein	1 günlük	Erkek	Merkez/Aydın	ölu
2	Holstein	20 günlük	Erkek	Baltaköy/Aydın	ölu
3	Holstein	3 aylık	Erkek	Baltaköy/Aydın	ölu
4	Holstein	20 günlük	Dişi	Baltaköy/Aydın	ölu
5	Holstein	2 aylık	Erkek	Torbali/İzmir	ölu
6	Holstein	20 günlük	Erkek	Baltaköy/Aydın	ölu
7	Montofon	20 günlük	Dişi	Işıklı/Aydın	canlı
8	Holstein	20 günlük	Erkek	Işıklı/Aydın	canlı
9	Holstein	8 günlük	Dişi	Karpuzlu/Aydın	ölu
10	Holstein	10 günlük	Dişi	Baltaköy/Aydın	ölu
11	Holstein	1 aylık	Dişi	Merkez/Aydın	ölu
12	Holstein	2 aylık	Erkek	Koçarlı/Aydın	ölu
13	Holstein	4 aylık	Dişi	Selendi/Manisa	ölu
14	Holstein	1 aylık	Dişi	Selendi/Manisa	ölu
15	Holstein	10 günlük	Dişi	Germencik/Aydın	ölu
16	Holstein	1 günlük	Erkek	Nazilli/Aydın	ölu
17	Holstein	5 aylık	Dişi	Merkez/Aydın	ölu
18	Holstein	35 günlük	Erkek	Baltaköy/Aydın	ölu
19	Holstein	35 günlük	Dişi	Baltaköy/Aydın	ölu
20	Holstein	35 günlük	Dişi	Baltaköy/Aydın	ölu
21	Holstein	2 günlük	Erkek	Buldan/Denizli	ölu

3. BULGULAR

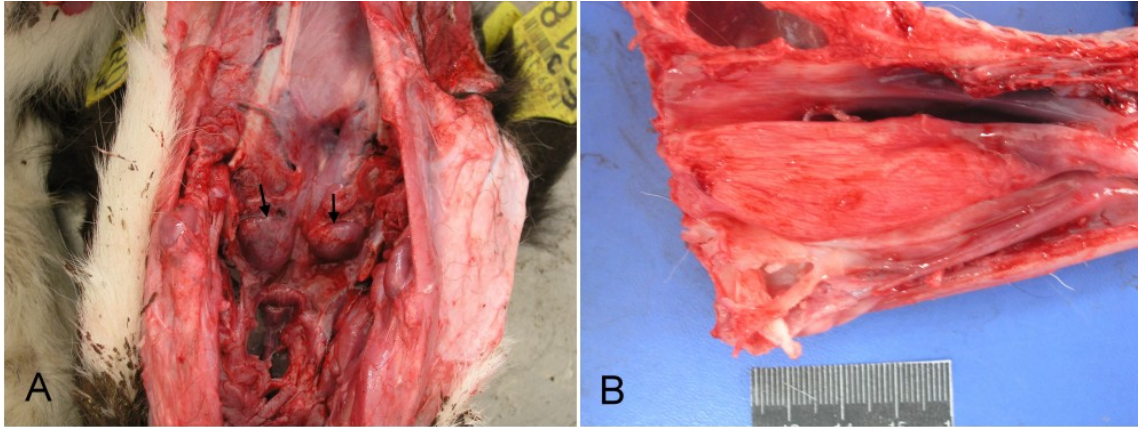
3.1. Klinik Bulgular

Ölmek üzere olan, terminal sinirsel bulgular gösteren ve ötenazisi gerçekleştirilen hayvanlarda (Olgu no; 7, 8) klinik olarak; çene kaslarında kasılmalar, diş gıcırdatma, nistagmus ve opistotonus görüldü. Ayağa kalkamama, yatalak durum ile bacak kaslarında tremor, tetanik kasılmalar ve inkoordinasyon dikkat çekti. Hayvan sahiplerinden ve klinisyen veteriner hekimlerden alınan anamnez bilgilere göre ilk bulguların anoreksi, çevreye karşı ilgisizlik ve depresif durum şeklinde olduğu, inkoordinasyon, ataksi, tremor ve konvülsiyonlarla devam ederek koma hali ile sonuçlandığı kaydedildi (Olgu no; 2, 3, 4, 6, 10, 18-21). Diğer olgularda (Olgu no; 1, 9, 11-17) detaylı anamnez veri alınamamakla birlikte genel sinirsel bulguların varlığı teyit edildi. Bir olguda ise (Olgu no; 5) herhangi bir klinik bulgu görülmeden ani ölüm şekillendiği bildirildi.

3.2. Nekropsi Bulguları

Makroskobik olarak, olguların tümünde karakteristik bir bulgu ile karşılaşılması ve nonspesifik bulgular ön plandaydı. Bu bulgular, kaşeksi ile birlikte burun, merme, serebral hemisferler ve sinuslarda görülen vasküler değişikliklerdi. Mermede kızarıklık (Olgu no; 18-21) ve burun delikleri yakınındaki mukozada hiperemi (Olgu no; 18-21) dikkati çekti. Mermede ve burun delikleri yakınındaki mukozada görülen hiperemi bir olguda (Olgu no; 21) diğerlerine göre oldukça şiddetli idi. Beynin makroskobik incelemesinde olguların genelinde serebral sulkusların genişlediği ve ileri derecede konjesyonlu olduğu dikkati çekti (Resim1). Sinusların incelemesinde sinus mukozasının ve konkaların ileri derecede hiperemik olduğu görüldü (Olgu no; 18-21) (Resim 2.B.). Bu bulguların yanı sıra bir olguda (Olgu no; 20) farinks mukozası da konjesyonlu ve tonsiller şişkindi (Resim 2.A.). Bunlara ek olarak olguların büyük bir kısmında idrar keselerinin aşırı şişkinliği ile karakterize idrar retensiyonu çarpıcı bir bulgu olarak kaydedildi (Olgu no; 1-4, 6-8, 10-12, 15-20) (Resim 3). İdrar keselerine yapılan palpasyonda, idrarın orifisyum üretra eksternadan aktığı ve idrar yollarında herhangi bir mekanik tıkanıklığın olmadığı belirlendi.

Resim 1. Serebral sulkuslarda genişleme ve ileri derecede konjesyon (Oklar), olgu no; 4.



Resim 2. A. Tonsillerde şişkinlik (Oklar) ve konjesyon ile farinks mukozasında konjesyon, olgu no; 21
B. Sinus mukozası ve konkalarda konjesyon, olgu no; 21

Resim 3. İdrar kesesinde şiddetli dilatasyon ve idrar retensiyonu (Oklar), olgu no; 7

3.3. Histopatolojik Bulgular

Serebral hemisferler, serebellum, beyin kökü ve medulla spinalisin histopatolojik incelemesinde, şekillenmiş olan belli başlı lezyonların olgularda görülme oranı Çizelge 10'da sunulmuştur. Bulguların hepsi bir olguda ya da aynı olgunun tüm sinir dokusu kesitlerinde bir arada görülmemekle birlikte olguların tümü genel olarak değerlendirildiğinde şekillenen başlıca lezyonlar değişen derecelerde; damarlarda hiperemi, perivasküler kanama, perivasküler ve/veya perinöronal ödem, nöron dejenerasyonu ve/veya nekrozu, satellitozis/nöronofaji, santral ya da perifer kromatolizis, diffuz ya da fokal gliozis, perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonu, meningitis ve demyelinizasyon idi. Yapılan incelemelerde merkezi sinir sisteminin hiçbir bölümünde inklüzyon cisimciğine rastlanmadı.

Çizelge 9. Başlıca histopatolojik lezyonların olgulara göre dağılım oranları.

	Kanama	Gliozis	Perivasküler infiltrasyon	Meningitis	Demyelinizasyon
Serebral hemisferler	5/21	20/21	5/21	5/21	16/21
Serebellum	2/21	21/21	0/21	0/21	18/21
Beyin kökü	6/21	21/21	0/21	0/21	18/21
Medulla spinalis	1/21	19/21	0/21	0/21	15/21

3.3.1. Serebral Hemisferler

Olguların tümünde beyinin genelinde damarların hiperemik olduğu görüldü (Olgu no; 1-21). Özellikle hipereminin şiddeti ile kapillar damarların oldukça belirgin hale geldiği beyin kesitleri mevcuttu (Olgu no; 1-3, 10, 18, 19). Hipereminin yanı sıra kanamalara da rastlandı. Kanamalar özellikle orta ve büyük çaplı damarların perivasküler boşluklarında şekillenmişti (Olgu no; 1, 2, 4, 14, 17) ve bu kanamalar iki olguda (Olgu no; 1, 2) daha şiddetli idi. Beş olguda (Olgu no; 4, 5, 10, 14, 17) perivasküler ödem ile Virchow-Robin boşluklarında genişlemeler göze çarptı. Bu vasküler değişikliklerin yanı sıra tek ya da iki sıralı perivasküler hücre infiltrasyonları görüldü (Olgu no; 4, 5, 14, 17-19). Benzeri infiltrasyonlara üç olguda (Olgu no; 17, 18, 19) meninks damarlarında da dikkati çekti.

Glial hücre proliferasyonları bir olgu hariç (Olgu no; 16) olguların tümünde diffuz ve/veya fokal olarak farklı şiddet ve yayılımda kendini gösterdi. Prolifere olan glial hücreler, çekirdek morfolojileri dikkate alındığında, ağırlıklı olarak oligodendroglialar ve astroglialardan ve daha az olarak da mikroglialardan şekillenmişti. Substansiya albada olgulara göre farklı dağılımlar gösteren gliozis üç olguda (Olgu no; 1, 2, 12) özellikle paraventriküler alanlarda yoğunlaşmıştı (Resim 4.A.). Bunun yanı sıra aynı olgularda hem küçük fokal glial odaklar hem de diffuz gliozis alanları da mevcuttu. Fokal glial odaklar sınırlı sayıda olguda (Olgu no; 1-4, 10, 15) görüldü (Resim 4.B.). Bu odaklar substansiya albada 10-15 hücrelik küçük kümeler halinde rastgele dağılım gösterirken, bir olguda (Olgu no; 15) ise lokal diffuz dağılımlı idi (Resim 4.C.).

Demyelinizasyon en dikkat çeken lezyonlardan biri idi (Resim 4.D.). Beş olgu hariç (Olgu no; 5, 6, 9, 10, 16), bütün hayvanlarda görüldü. Dantela şeklinde tanımlanan demyelinize sahalar genellikle genişlemiş ve vakuolasyon gösteren sitoplazmaya sahip fagositik gitter hücreleri ile doldurulmuştu. Luxol fast blue myelin boyası ile yapılan boyamalar da bu lezyonların demyelinize sahalar olduğunu teyit etti.

- Resim 4. A. Paraventriküler alanda multifokal gliozis (Oklar), serebral hemisfer, olgu no; 12. HE. Bar=100 µm.
B. Fokal glial odak, serebral hemisfer, beyin, olgu no; 10. HE. Bar=30 µm.
C. Diffuz glial hücre proliferasyonları, serebral hemisfer, olgu no; 15. HE. Bar=50 µm.
D. Substansiya albada demyelinize sahalar, (Oklar), serebral hemisfer, olgu no; 18. HE. Bar=30 µm.

Nöronal değişiklikler perinöronal ödem, dejenerasyon ve nekroz temelinde izlendi. Stratum piramidale ve stratum molekülaredaki dejeneratif nöronların sitoplazmaları şişkin ve soluk renkte idi (Olgu no; 1-10, 12, 14, 17, 18). Koyu eozinofilik sitoplazmalı ve

piknotik çekirdekli büzüşmüş nöronlarla ile karakterize nekrozlar ise yedi olguda (Olgu no; 3, 11-13, 14, 17, 18) saptandı. Bu ve buna benzer görünümde olan dejeneratif ya da nekrotik nöronların bir kısmının glial hücreler tarafından kuşatıldığı ve satellitozisin şekillendiği belirlendi (Olgu no; 2-4, 10, 12, 13). İki olguda ventrikülü döşeyen ependim hücre katmanında proliferasyon sonucu ondülasyonların varlığı göze çarptı (Olgu no; 2, 8). Olguların birinde (Olgu no; 18) ise santral kromatolizis belirlendi.

3.3.2. Serebellum

Olguların tümünde serebellumun genelinde damarların hiperemik olduğu görüldü (Olgu no; 1-21). Yalnızca bir olguda perivasküler kanama belirlendi (Olgu no; 2). Perivasküler hücre infiltrasyonları görülmedi. Gliosis (Olgu no:1, 2, 6-8, 11, 16, 18, 19) substansiya albada diffuz dağılımlı idi. Prolifere olan glial hücreler, çekirdek morfolojilerine göre, ağırlıklı olarak oligodendrogilialar, astrogilialar ve daha az olarak da mikrogilialardan oluşmuştu. Substansiya albada demyelinize sahalar, üç olgu hariç (Olgu no; 5, 14, 18), diğerlerinde mevcuttu. Bu lezyon beş olguda (Olgu no; 1, 6, 9, 11, 17) oldukça şiddetli idi. Nöronlardaki değişiklikler (Olgu no; 2, 3, 14-17, 19) Purkinje hücreleri ve substansiya albadaki primidal nöronlarda büzüşme ile karakterize idi.

3.3.3. Beyin Kökü

Olguların tümüne genel olarak bakıldığında damarlar hiperemikti (Olgu no; 1-21). Perivasküler kanamalar (Olgu no; 1, 2, 4, 5, 10, 13, 16) küçük, orta ve büyük çaplı damarların her birinde seçilebilmekte idi. Üç olguda ise aynı zamanda perivasküler ödem görüldü (Olgu no; 5, 6, 10). Gliosis beyinin bu bölümünde en dikkat çekici lezyondu; bir olgu (Olgu no; 3) hariç bütün hayvanlarda tanımlandı. Gliosis genel olarak diffuz dağılımlıydı, altı olguda (Olgu no; 6, 13, 17-20) diğerlerine nazaran oldukça şiddetliydi.

Demyelinizasyon üç olgu (Olgu no; 4, 14, 16) hariç, diğerlerinde değişen şiddette şekillenmişti. Nöronal değişiklikler perinöronal ödem, dejenerasyon ve nekroz şeklindeydi. Dejenerasyon kimi olgularda (Olgu no; 3, 4, 5, 14-15, 18, 19) özellikle motor nöronların sitoplazmalarının şişkin ve soluk renkte boyanması ile karakterize idi. Bunun yanı sıra nöronların bir kısmında Nissl cisimciklerinin gözden silindiği; periferik (Olgu no; 3, 4, 14) ya

da santral kromatolizis (Olgu no; 9, 16) şekillendiği görüldü. Nekroz ise nöronlardaki bü-züşme ile karakterizydi (Olgu no; 9, 10, 14, 15-19): sitoplazma koyu eozinofilik, çekir-dekte karyoreksis, piknoz daha az olarak da karyolizis görüldü. Bu ve buna benzer görü-nümde olan dejeneratif ya da nekrotik nöronların bir kısmının glial hücreler tarafından ku-şatıldığı satellitozis görünümü dikkati çekti (Olgu no; 10, 16-19). Bu lezyonlara ek olarak yalnızca bir olguda ventrikülü döşeyen ependim hücre katmanında proliferasyon sonucu ondülasyonların varlığı göze çarptı (Olgu no; 3).

3.3.4. Medulla Spinalis

İki olguda herhangi bir lezyona rastlanmadı (Olgu no; 10, 13). Damarlarda hiperemi belirgindi (Olgu no; 2, 8, 9, 11, 12, 16, 19) ve iki olguda (Olgu no; 1,2) perivasküler kana-ma saptandı. Olguların tümünde genelde diffuz gliozis tanımlanmakla, üç olgudaki (Olgu no; 1, 2, 18) ise şiddet ve yayılım bakımından diğerlerine göre daha dikkat çekici idi. Sekiz olgu (Olgu no; 2, 3, 5, 9, 10, 13-16) hariç, diğerlerinde demyelinizasyon şekillenmişti. Özellikle ventral kornuda yerleşim gösteren motor nöronların sitoplazmaları şişkin ve açık renkte boyanmıştı (Olgu no; 2, 3, 5, 8, 15, 17, 19). Bu nöronlardan bazıları, çekirdekler gözden kaybolarak, nekrotik bir hal almıştı. Kimi nöronlarda ise bü-züşme ile karakterize nekrotik değişiklikler kaydedildi (Olgu no; 11, 12, 15, 18). Bir olguda (Olgu no; 2) nekro-tik nöronlar çevresinde satellitozis göze çarptı. Ayrıca kesitlere yansıyan dorsal kök ganglionlarındaki nöronlarda yer yer dejeneratif değişiklikler ile birlikte bu alanlarda yan-gısal reaksiyonlar dikkati çekti (Olgu no; 16-20).

3.4. MSS’de BHV-5 Antijenin İmmunohistokimyasal Dağılımı

Antijenik yakınlığı nedeniyle BHV-1 enfeksiyon şüphesini ortadan kaldırmak ama-cıyla BHV-1 monoklonal antikoru ile yapılan immunohistokimyasal boyama sonuçlarında MSS kesitlerinde BHV-1 antijenik boyanma negatif olduğu görüldü.

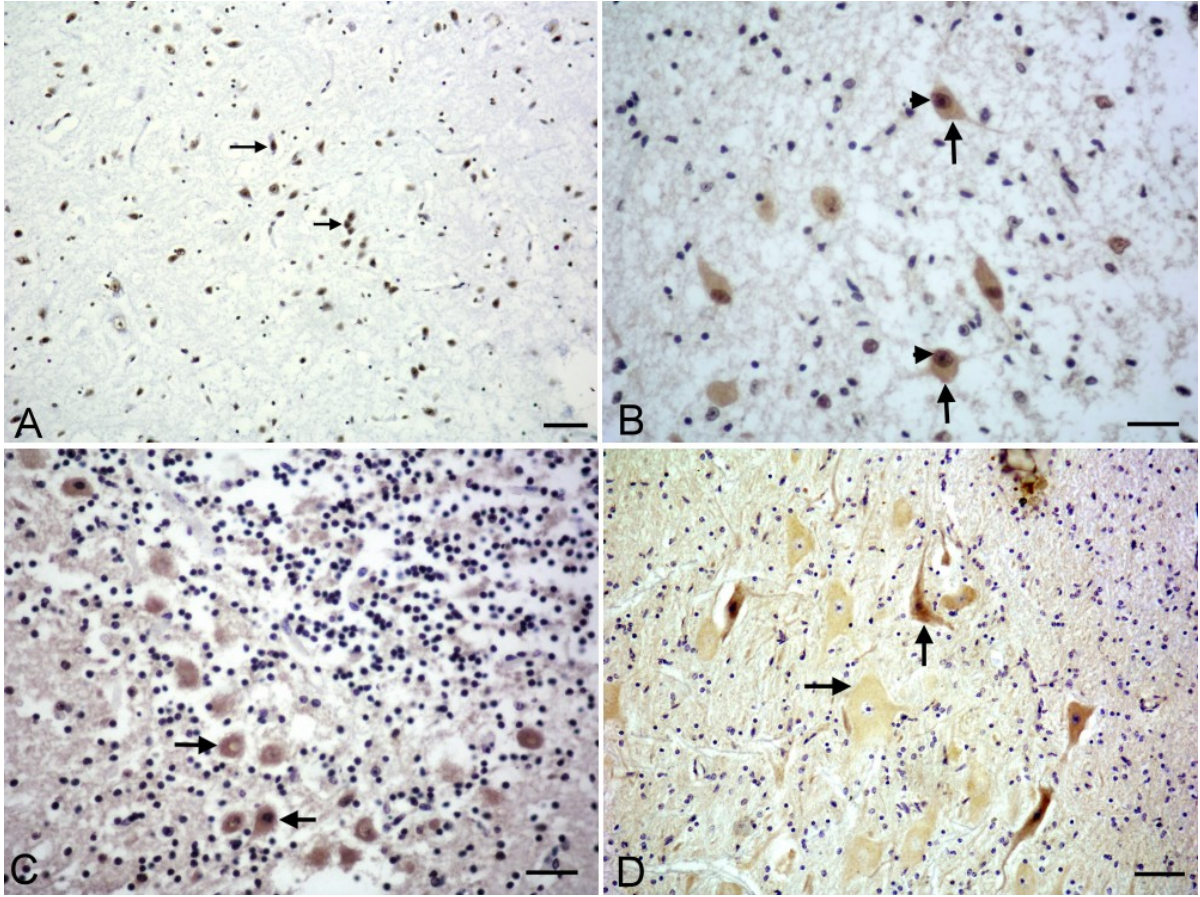
BHV-5 monoklonal antikoru ile yapılan immunohistokimyasal boyamalar sonucunda olguların tümünde ve tüm merkezi sinir sistemi doku kesitlerinde antijen pozitif immunreaksiyonlar elde edildi. Bu reaksiyonlar, olgulara göre ve MSS’nin bölgelerine göre, farklı dağılım ve şiddette idi.

Serebral hemisferlerde diffuz ve/veya fokal glial hücre proliferasyonlarının olduğu alanlarda proliferen olan glial hücrelerin çekirdekleri, sitoplazmaları ve uzantılarında immunopozitif reaksiyonlar belirlendi (Olgu no; 1-3, 5, 7, 9, 12, 15, 16, 17, 19, 20) (Resim 5.A.). İki olguda (Olgu no; 9, 15) viral antijen pozitif reaksiyonlara glial hücrelerde nadiren rastlanırken, kimilerinde ise (Olgu no; 4, 10, 11) ise izlenmedi. Buna ilaveten üç olguda (Olgu no; 1, 2, 12) paraventriküler alanlardaki glia hücrelerinde de yaygın pozitiflik dikkati çekti. Nöronlarda çekirdek ve sitoplazmik boyanmalar ile birlikte sitoplazmik uzantılarda da viral antijen pozitif boyanmalar mevcuttu. Bazı olguların nöronlarında çekirdek ve sitoplazmik pozitif reaksiyonların birlikte olduğu dikkati çekti (Olgu no; 18-21) (Resim 5.B.). Bunun yanı sıra kortekste nöropildeki pozitif reaksiyonlar çizgisel ya da fokal diffuz boyanmalar şeklinde göze çarptı (Olgu no; 1-3, 7, 12, 18-20).

Serebellumda korteks tabakasında özellikle dejeneratif ve nekrotik değişikliklerin görüldüğü nöronların sitoplazmalarında immunopozitif reaksiyonlar görüldü. Bununla birlikte, santral kromatolizisin şekillendiği bazı nöronlarda (Olgu no; 18) da viral antijen belirlendi. İki olguda (Olgu no; 2, 8) proliferen ependim hücrelerinde pozitif reaksiyonlar elde edildi. Pozitif reaksiyonlar, başta Purkinje hücrelerinin sitoplazmaları olmak üzere diğer nöronların bir kısmında da dikkati çekti (Olgu no; 2, 3, 6, 12, 14-17, 19) (Resim 5.C.). Substansiya albada glial hücrelerinin özellikle çekirdeklerinde, yer yer de sitoplazma ve uzantılarında pozitif immunreaksiyonlar tanımlandı (Olgu no; 1, 2, 6-8, 11, 16, 18, 19).

Beyin kökünde, fokal ya da diffuz gliozisin şekillendiği sahalarda, glial hücre çekirdekleri ve sitoplazmik uzantılarında viral antijen pozitif reaksiyonlar belirlendi (Olgu no; 6, 13, 16, 18-21). Bununla birlikte özellikle dördüncü ventrikulus sınırındaki glial hücrelerde benzer reaksiyonlar mevcuttu. Ponsun nöropilinde de geniş alanlar halinde ya da çizgisel tarzda reaksiyonlara rastlandı (Olgu no; 12, 15). Nöronlardaki pozitif reaksiyonlar (Olgu no; 1-21) başta motor nöronlar olmak üzere dejeneratif/nekrotik olan ya da olmayan, hemen hemen tüm nöronlarda çeşitli yaygınlık ve şiddet derecelerinde; çekirdek, sitoplazma ve uzantılarında saptandı (Resim 5.D.). Olguların bazılarında nöronlarda şiddetli pozitif reaksiyonlara rastlanırken, glial hücrelerde ise dikkati çekmedi (Olgu no; 10, 14). Buna ilaveten bir olgunun (Olgu no; 14) ependim hücrelerinde pozitif reaksiyonlar seçildi.

Medulla spinaliste, özellikle ventral kornuda yerleşim gösteren motor nöronların sitoplazmalarında ve yer yer de bazılarının çekirdeklerinde immunreaksiyonlar belirlendi (Olgu no; 2, 3, 5, 8, 15, 17, 19) (Resim 6.A.). Bir olgu hariç (Olgu no; 10) diğer olgularda immunopozitif boyanmalar glia hücreleri ve uzantılarında da mevcuttu. Benzer antijen pozitif reaksiyonlar dorsal kök ganglionlarındaki nöronlarda da kendini gösterdi (Olgu no; 16-20) (Resim 6.B.).

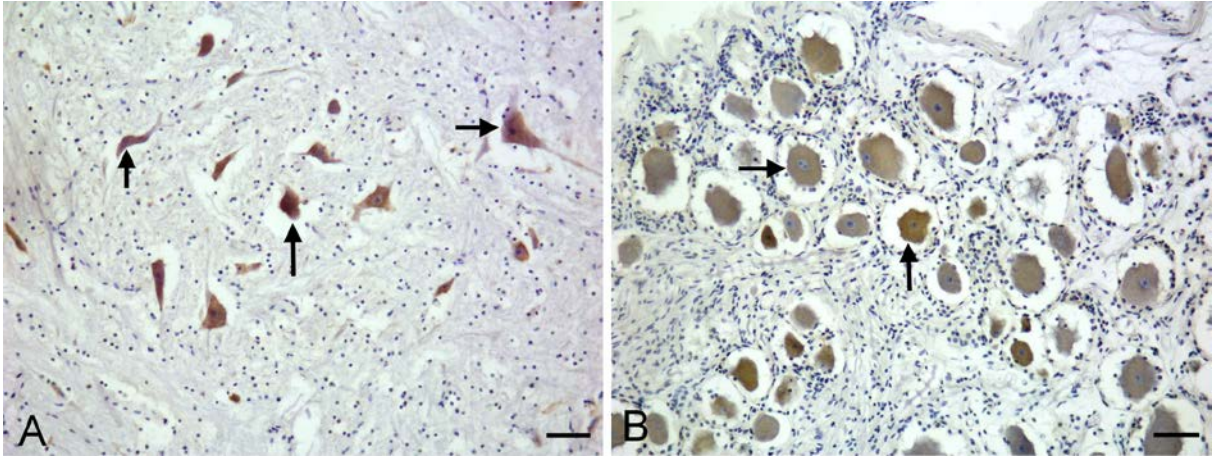


Resim 5. A. Prolifere glial hücrelerde BHV-5 viral antijen immunopozitif reaksiyonlar (Oklar), serebral hemisfer, olgu no; 17. ABC metot. Bar=50 μ m.

B. Nöron çekirdekleri (Ok başları), sitoplazmaları ve uzantılarında (Oklar) BHV-5 viral antijen immunopozitif reaksiyonlar, serebral hemisfer, olgu no; 19. ABC metot. Bar=30 μ m.

C. Dejenere ve nekrotik Purkinje hücrelerinde BHV-5 viral antijen immunopozitif reaksiyonlar (Oklar), serebellum, olgu no; 15. ABC metot. Bar=30 μ m.

D. Dejenere ve nekrotik motor nöronlarda BHV-5 viral antijen immunopozitif reaksiyonlar (Oklar), medulla oblongata, olgu no; 7. ABC metot. Bar=30 μ m.



Resim 6. A. Dejeneratif ve nekrotik motor nöronların çekirdek, sitoplazma ve uzantılarında BHV-5 viral antijen immunopozitif reaksiyonlar (Oklar), medulla spinalis, olgu no; 18. ABC metot. Bar=50 µm.
B. Nöron sitoplazmalarında (Oklar) BHV-5 viral antijen immunopozitif reaksiyonla, dorsal kök gangliyonu, olgu no; 18. ABC metot. Bar=50 µm.

3.5. MSS'de Apoptozis Bulguları

3.5.1. TUNEL Pozitif Reaksiyonlar

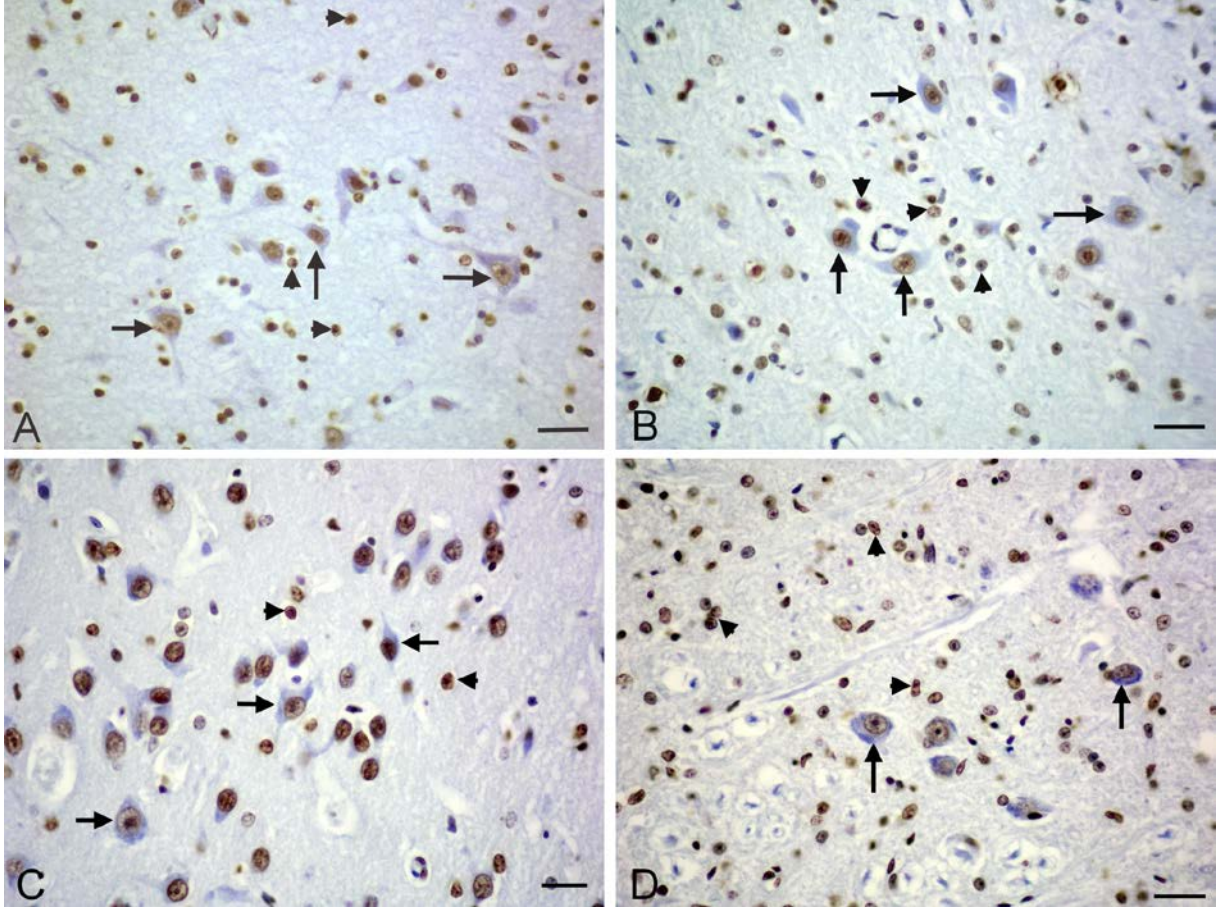
Tüm olgularda MSS'de DNA kırılmalarını işaret eden TUNEL pozitif reaksiyonlar, genel olarak BHV-5 antijen pozitif immunreaksiyonların lokalize olduğu alanlardaki nöronlarda ve glial hücrelerde dağılım gösterdi. MSS'de serebral hemisfer ($r=0,942$), serebellum ($r=0,889$), beyin kökü ($r=0,939$) ve medulla spinaliste ($r=0,957$) TUNEL pozitif hücreler ile BHV-5 viral antijen pozitif hücrelerin semikantitatif değerlendirmelerinde istatistiksel olarak ileri düzeyde önemli, pozitif yönde korelasyon saptandı ($P<0,001$).

Bununla birlikte, semikantitatif olarak değerlendirilen TUNEL pozitif hücrelerin, serebral hemisfer, serebellum, beyin kökü ve medulla spinalis bölümlerindeki düzeyleri arasında istatistiksel olarak önemli fark olduğu görüldü ($P<0,05$).

Serebral hemisferlerin korteks katmanlarındaki küçük ve büyük nöronların çekirdeklerinde TUNEL pozitif reaksiyonlar kaydedildi (Resim 7.A). Benzer reaksiyonlar kortekste glial hücrelerde ve özellikle substansiya albada yer alan glial hücrelerin çekirdeklerinde de görüldü (Resim 7.A). Olguların büyük çoğunluğunda (Olgu no; 1, 5, 8, 16, 19-21) TUNEL pozitif reaksiyonların geniş bir sahada yayılım gösterdiği göze çarptı. BHV-5 antijen pozitif reaksiyonlarla TUNEL pozitif reaksiyonların lokalizasyonu ve hücre dağılımları karşılaştırıldığında, virüs enfekte hücreler ile TUNEL pozitif hücrelerin aynı sahada dağılım gösterdiği dikkati çekti.

Serebellumda TUNEL pozitif reaksiyonlar, serebral hemisferdekilere nazaran, daha dar bir yayılıma sahipti. Pozitif boyanmalar, hem stratum molekülaredaki nöronlarda (Resim 7.C.) hem de stratum gangliozum katmanında yer alan Purkinje hücrelerinin çekirdeklerinde ve substansiya albada glial hücrelerin çekirdeklerinde görüldü.

Beyin kökündeki TUNEL pozitif reaksiyonlar, serebelluma göre daha geniş, serebral hemisferlerden ise daha dar yayılıma sahipti. Pozitif reaksiyonlar nöron ve glial hücrelerin çekirdeklerinde göze çarptı (Resim 7.B.). TUNEL pozitif reaksiyonun dağılımı MSS'nin diğer bölgelerine nazaran medulla spinaliste daha düşüktü. Pozitif reaksiyonların lokalizasyonu somatomotorik ve kolumnar nöron çekirdekleri ile substansiya albada glial hücrelerin çekirdeklerinde dağılım göstermişti (Resim 7.D.). Dört olguda (Olgu no; 6, 7, 9, 10) bu hücrelerdeki reaksiyonların dağılımı oldukça sınırlı idi.



Resim 7. A. Kortekste, küçük ve büyük nöronların çekirdeklerinde (Oklar) ve glial hücre çekirdeklerinde (Ok başları) TUNEL pozitif reaksiyonlar, serebral hemisfer, olgu no; 8. TUNEL metot. Bar=30 μ m.

B. Nöron çekirdeklerinde (Oklar) ve glial hücre çekirdeklerinde (Ok başları) TUNEL pozitif reaksiyonlar, beyin kökü, olgu no; 12. TUNEL metot. Bar=30 μ m.

C. Nöron çekirdeklerinde (Oklar) ve glial hücre çekirdeklerinde (Ok başları) TUNEL pozitif reaksiyonlar, serebellum, olgu no; 8. TUNEL metot. Bar=50 μ m.

D. Nöron çekirdeklerinde (Oklar) ve glial hücre çekirdeklerinde (Ok başları) TUNEL pozitif reaksiyonlar, medulla spinalis, olgu no; 8. TUNEL metot. Bar=50 μ m.

3.5.2. Aktif Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9 ve Bcl-2 İmmunreaksiyonları

Apoptozis ve yolaklarının belirteçlerinden aktif kaspaz-3, -8, -9 immunpozitif reaksiyonlar MSS'de olgulara ve bölgelere göre değişen dağılım ve şiddette glial hücre, nöronlar ve uzantıları ile nöropilde saptandı. İmmun reaksiyonlar daha çok glial hücreler ile ilişkiliyken, pozitif reaksiyonların görülme oranı nöronlarda daha düşüktü. MSS'de serebral hemisferler, serebellum, beyin kökü ve medulla spinalis'te aktif kaspaz-9 pozitif hücreler

aktif kaspaz-8'den daha yüksek oranlarda olmasına karşın, istatistiksel olarak aralarındaki fark önemsizdi.

Serebral hemisferlerde aktif kaspaz-3 immunopozitif reaksiyonlar sekiz olguda (Olgu no; 1-4, 15, 16, 18, 21); kaspaz-8 on üç olguda (Olgu no; 1-4, 12-15, 17-21); kaspaz-9 on yedi olguda (Olgu no; 1, 5-15, 17-21) saptandı. Aktif kaspaz-8 ve -9 immunreaksiyonlarının ortak görüldüğü dokuz olgu mevcuttu (Olgu no; 12-15, 17-21). Her üç kaspaz türüne ait immunopozitif reaksiyonların birlikte görüldüğü olgular dört adet idi (Olgu no; 1, 15, 18, 21). Aktif kaspaz-3 ve -9 pozitif reaksiyonlar glial hücre ve uzantılarında ve daha düşük oranda nöronlarda görülürken, kaspaz-8 pozitif reaksiyonlar buna ek olarak korteksin tüm katmanlarındaki nöron sitoplazmaları ve uzantılarında da göze çarptı (Olgu no; 1, 19, 21) (Resim 8.A.).

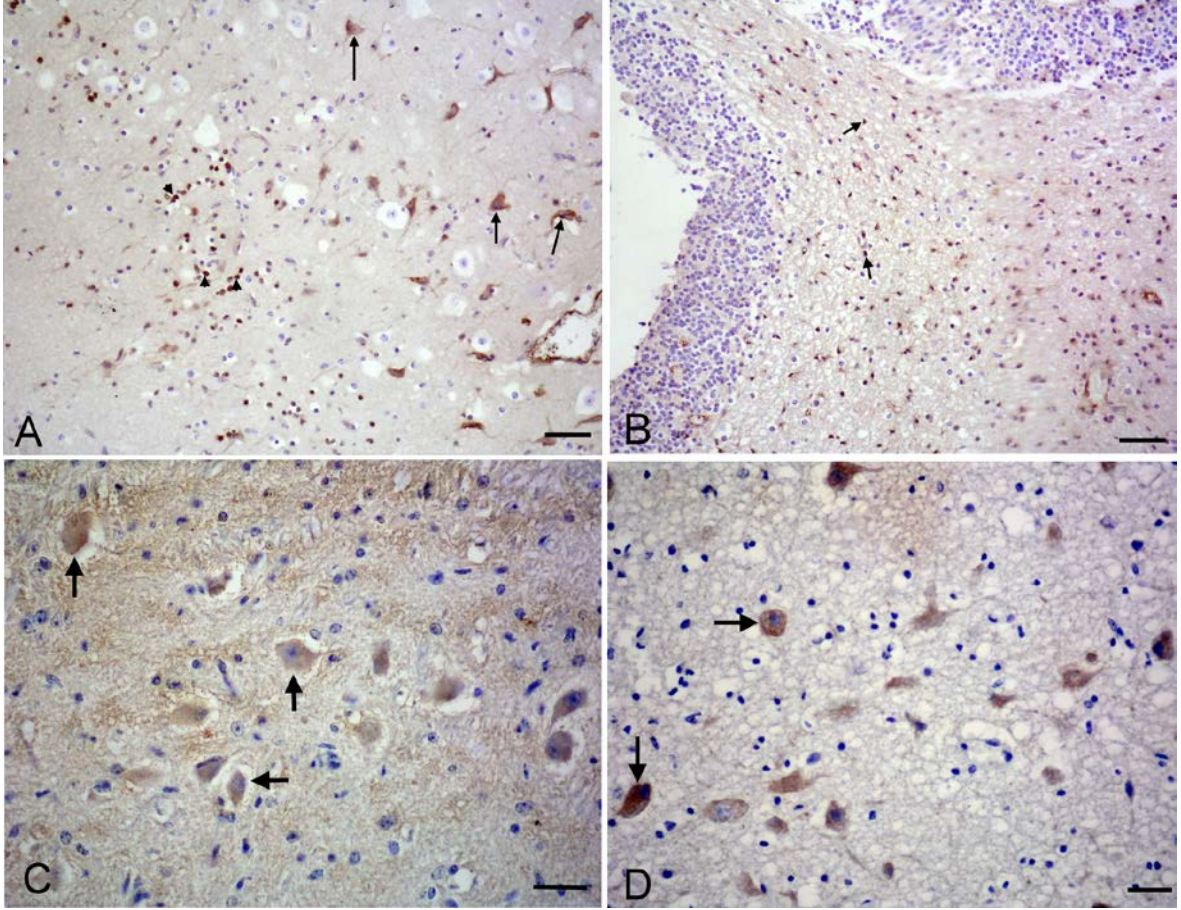
Serebellumda aktif kaspaz-3 immunreaktivite sekiz olguda (Olgu no; 1-4, 15, 16, 18, 21), aktif kaspaz-8 on olguda (Olgu no; 1-4, 15, 17-21), aktif kaspaz-9 on yedi olguda (Olgu no; 1, 5-7, 8-15, 17-21) saptandı. Her üç kaspaz türüne ait immunopozitif reaksiyonların birlikte görüldüğü olgular altı adet idi (Olgu no; 1, 15, 18-21). Kaspaz-8 ve -9 immunoreaksiyonları ortak olarak yedi olguda görüldü (Olgu no; 1, 15, 17-21). Aktif kaspaz-3, -8, -9 pozitif reaksiyonlar substansiya grisea ve albada prolifer olmuş glia hücreleri ve uzantılarında görülürken (Resim 8.B.) az sayıda olguda moleküler katmanda ve Pürkinje hücrelerinde de mevcuttu. Nöronlardaki kaspaz-3 aktivitesi üç olguda (Olgu no; 1, 19, 21), kaspaz-8 aktivitesi bir olguda (Olgu no; 19) ve kaspaz-9 aktivitesi iki olguda şekillenmişti (Olgu no; 13, 19).

Beyin kökünde, aktif kaspaz-3 immunopozitif reaksiyonları altı olguda (Olgu no; 1, 4, 16, 18, 19, 21), kaspaz-8 immunopozitif reaksiyonları onüç olguda (Olgu no; 1-4, 12-15, 17-21), kaspaz-9 immunopozitif reaksiyonları onyediy olguda (Olgu no; 1, 5-15, 17-21) saptandı. Kaspaz-8 ve -9 immunoreaksiyonları ortak olarak on olguda görüldü (Olgu no; 1, 12-15, 17-21). Her üç kaspaz türüne ait immunopozitif reaksiyonların birlikte görüldüğü olgular dört adet idi (Olgu no; 1, 18, 19, 21). Bunların üçünde (Olgu no; 1, 18, 21) belirgin pozitif boyanmalar kaspaz-3'e ilişkinken, birinde (Olgu no; 21) kaspaz-9 ile eşit seviyedeydi. En şiddetli ve yaygın kaspaz-3 immunopozitif reaksiyonlar iki olguda (Olgu no; 1, 18) görülürken bir olguda (Olgu no; 4) minimum seviyedeydi. Kaspaz-8 immunopozitif

boyanmaların oranının şiddetli seyrettiği olgular dört adet idi (Olgular no; 2, 3, 12, 15). Aynı şekilde kaspaz-9 immunoreaksiyonların belirgin şekilde görüldüğü olgular olgular no; 8, 12, 15 olarak sıralandı (Resim 8.C.). Kaspaz-3, -8 ve -9 immunreaktivitesi, prolifer olmuş glia hücre sitoplazmaları ve uzantılarında da mevcuttu. Bunun yanı sıra aktif kaspaz-8 reaksiyonlara beş olguda (Olgular no; 17-21) küçük ve büyük nöron sitoplazmalarında ve bunların uzantılarında da rastlandı.

Medulla spinaliste, aktif kaspaz-3 immunopozitif reaksiyonu beş olguda (Olgular no; 1, 4, 16, 18, 21), aktif kaspaz-8 on üç olguda (Olgular no; 1-4, 12-15, 17-21), aktif kaspaz-9 on yedi olguda (Olgular no; 1, 5-15, 17-21) saptandı. Her üç kaspaz türüne ait immunopozitif reaksiyonların birlikte görüldüğü olgular dört adet idi (Olgular no; 1, 18, 21). Kaspaz-8 ve -9'un beraber görüldüğü olgular 10 adetti (Olgular no; 1, 12-15, 17-21).

Apoptozisin inhibisyon mekanizmasında rol alan antiapoptotik Bcl-2 proteinine karşı yapılan immunohistokimyasal boyamalarda olgulara ve bölgelere göre değişen dağılım ve şiddette reaksiyonlar elde edildi. Bunlar özellikle MSS'de nöron sitoplazmalarında ve nöropilde görüldü. Bu boyanmalar glial hücre ve uzantılarında ise oldukça düşük seviyede idi ya da hiç boyanma görülmedi. MSS'nin tüm bölümlerinde özellikle aktif kaspaz-9 immunoreaksiyonlarının çok az düzeyde (Olgular no; 1, 18) ya da negatif olduğu (Olgular no; 2-4, 16) olgularda nöron sitoplazmalarında Bcl-2'ye ilişkin pozitif reaksiyonlar elde edildi (Resim 8.D.).



Resim 8. A. Kortekste, glial hücreler (Ok başları), nöron sitoplazmaları ve uzantılarında (Okklar) aktif kaspaz-8 pozitif reaksiyonlar, serebral hemisferler, olgu no; 19. ABC metot. Bar=50 μ m.

B. Glial hücrelerde (Okklar) aktif kaspaz-3 immunpozitif reaksiyonlar, serebellum, olgu no; 21. ABC metot. Bar=100 μ m.

C. Nöron sitoplazmalarında (Okklar) aktif kaspaz-9 immunpozitif reaksiyonlar, beyin kökü, olgu no; 8. ABC metot. Bar=50 μ m.

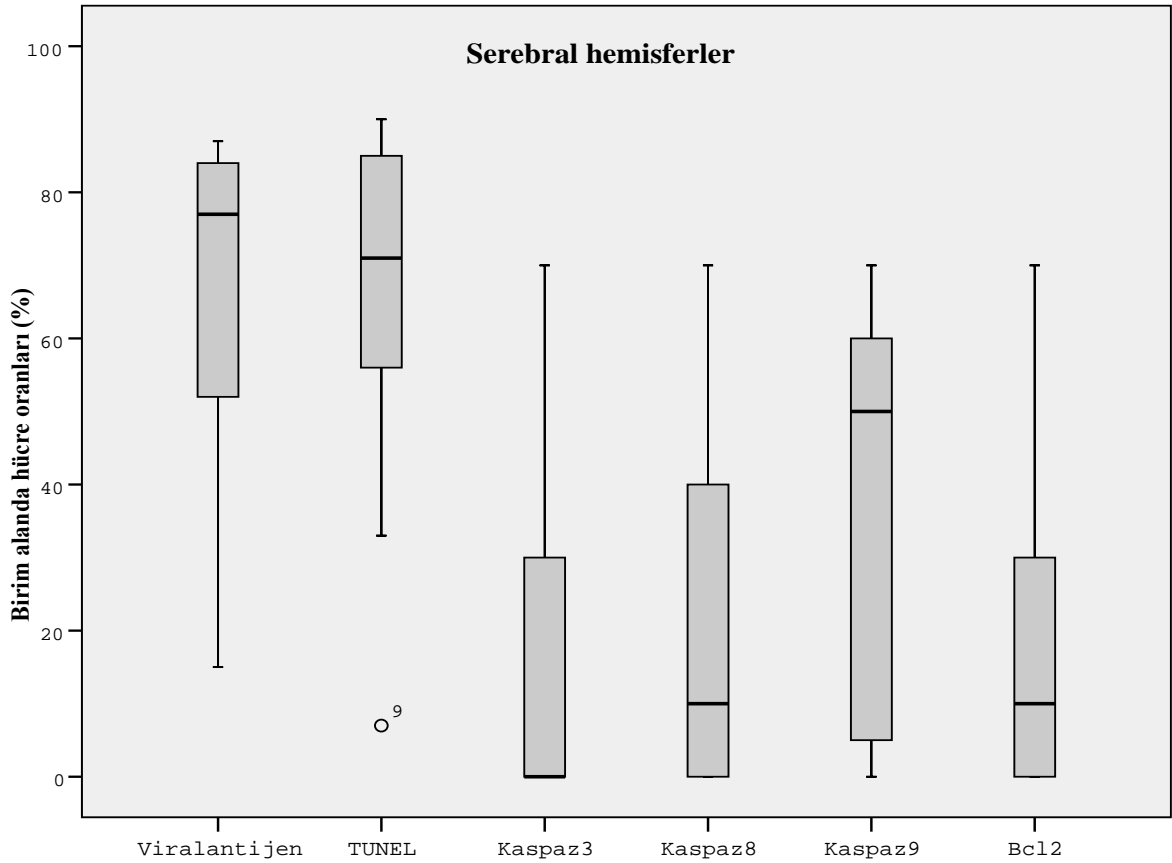
D. Nöron sitoplazmalarında (Okklar) Bcl-2 immunpozitif reaksiyonlar, serebral hemisfer, olgu no; 8. TUNEL metot. Bar=50 μ m.

3.6. İmmunohistokimyasal Boyama Sonuçlarının Analizi

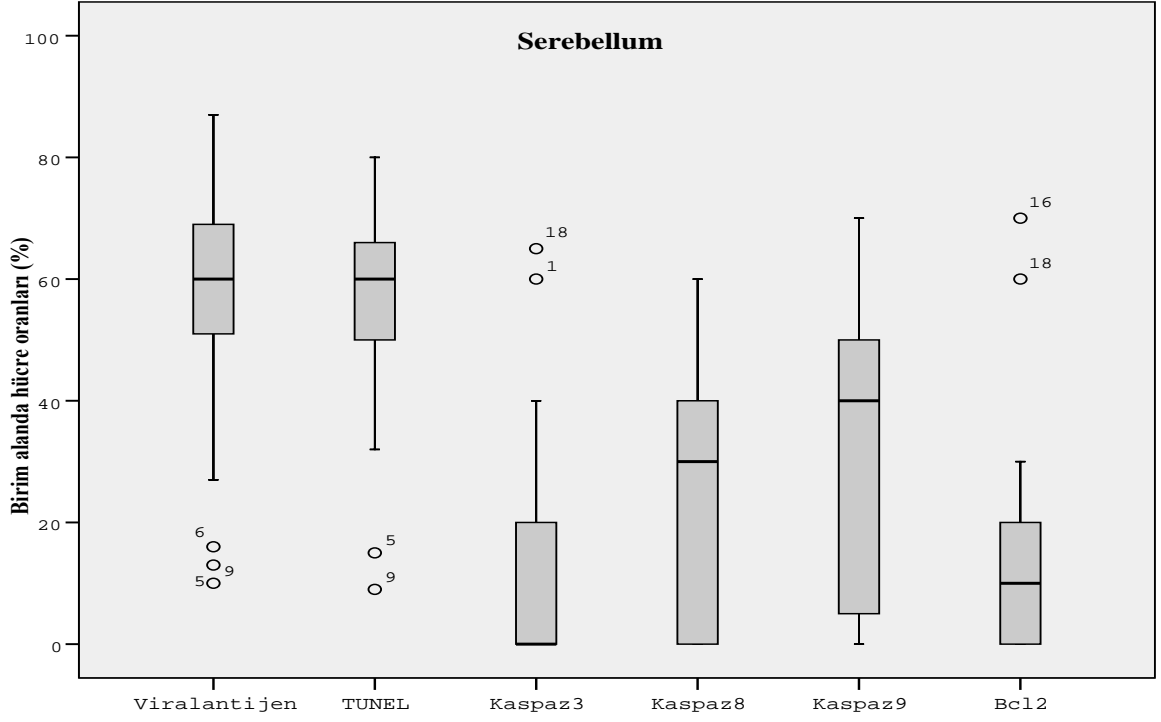
Bütün olgular temelinde, serebral hemisferler, serebellum, beyin kökü ve medulla spinaliste BHV-5 viral antijenin immunoreaktivitesi, TUNEL reaksiyon sonuçları ile kaspaz belirteçlerinin immunoreaktiviteleri semikantitatif olarak değerlendirildi. İmmunopozitif hücrelerin ortalama değerlerinin dağılımı serebral hemisferlerde Şekil 1’de, serebellumda Şekil 2’de, beyin kökünde Şekil 3’te, medulla spinaliste Şekil 4’te gösterilmiştir. Bu verilere göre, viral antijene ilişkin immunopozitif reaksiyon gösteren hücreler en

yoğun olarak sırasıyla serebral hemisferler, beyin kökü, medulla spinalis ve serebellumda elde edildi. TUNEL reaksiyon pozitif hücreler en yoğun olarak sırasıyla beyin kökü, beyin, medulla spinalis ve serebellumda belirlendi. Aktif kaspazlar arasında ise en yüksek oran aktif kaspaz-9 ile elde edilirken, bunu aktif kaspaz-8 ve aktif kaspaz-3 izledi. Bcl-2 reaksiyon oranları ise MSS’de aktif kaspaz-3 reaktivitesinden yüksek, aktif kaspaz-8 ve aktif kaspaz-9 reaktivitelerinden daha az olarak saptandı.

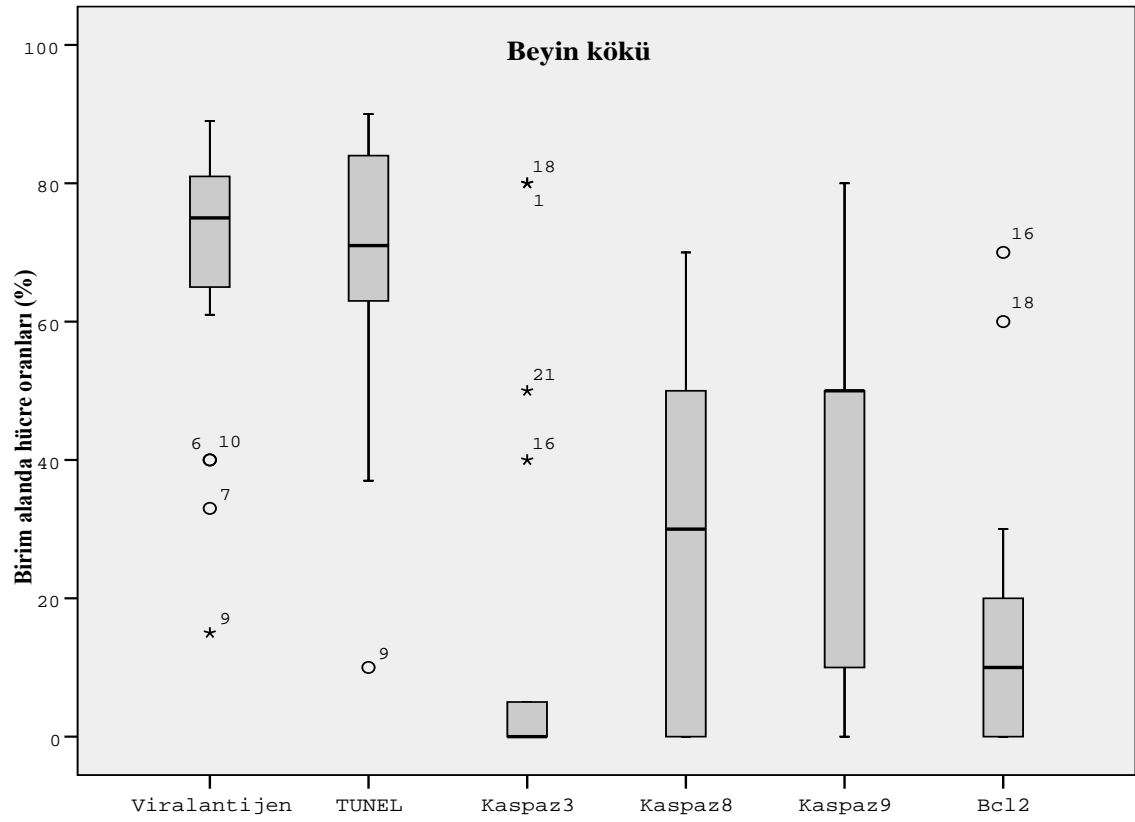
Serebral hemisfer, serebellum, beyin kökü ve medulla spinalis bölümleri arasında BHV-5 pozitif hücreler bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü. ($P<0,05$).



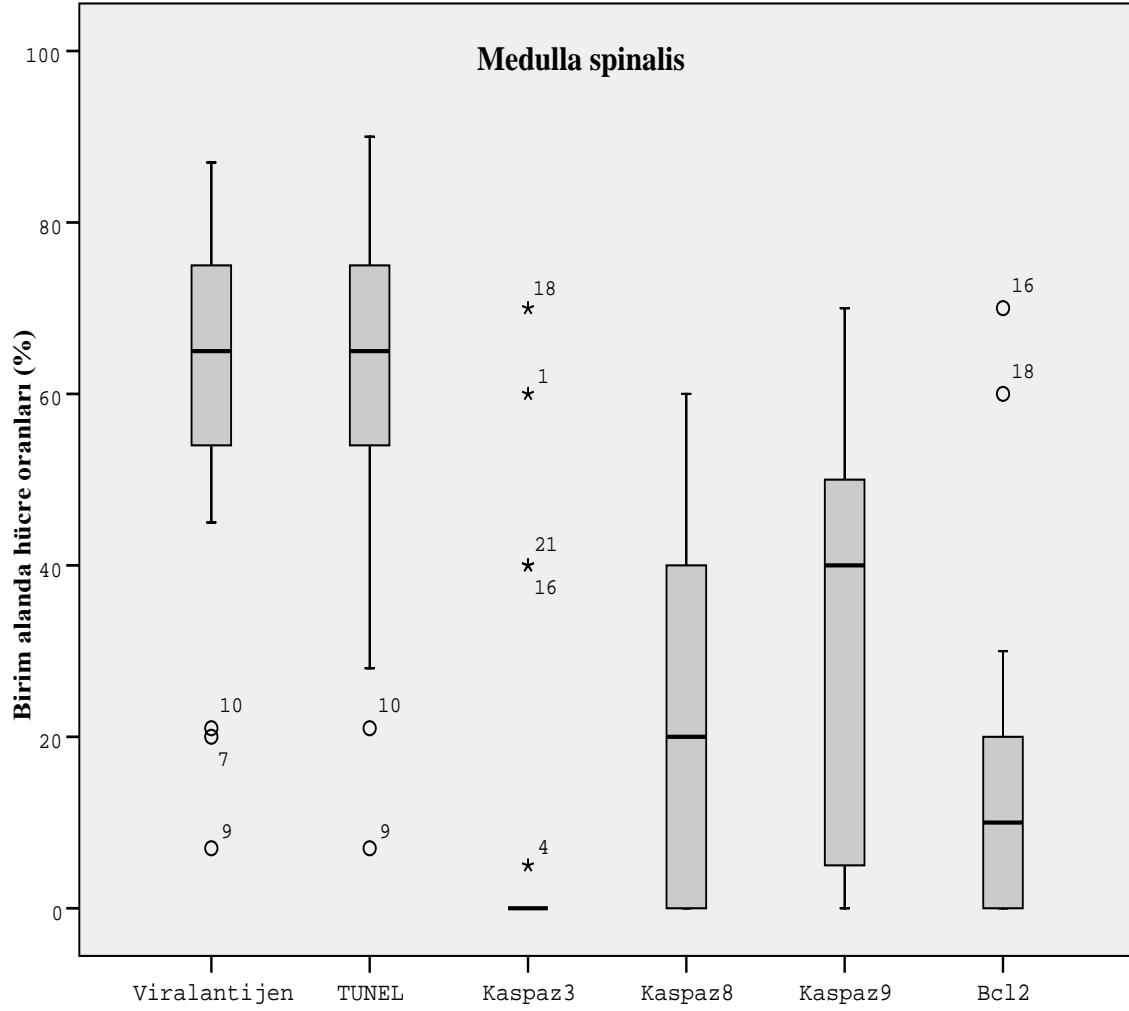
Şekil 1. Serebral hemisferlerde pozitif hücrelerin dağılım oranları.



Şekil 2. Serebellumda pozitif hücrelerin dağılım oranları.



Şekil 3. Beyin kökünde pozitif hücrelerin dağılım oranları.



Şekil 4. Medulla spinaliste pozitif hücrelerin dağılım oranları.

4. TARTIŞMA

BHV-5 enfeksiyonunda en sık bildirilen çene kaslarında kasılmalar, diş gıcırdatma, nistagmus, opistotonus, bacak kaslarında tremor, tetanik kasılmalar ve inkoordinasyon gibi sinirsel semptomlar (Caron ve ark 2002, Perez ve ark 2002), çalışmada olgularının % 95,23'ünde kaydedilmiştir. Hastalığın son dönemlerinde kaydedilen bulgulardan kendi etrafında dönme görülmemiş olup, buna karşın bacakların pedal hareketi şeklinde oynatılması ise iki olguda belirlenmiştir (Perez ve ark 2002).

Literatür verilerde BHV-5 enfeksiyonu ile özdeşleşmiş makroskobik bir bulgu tanımlanmamıştır, ancak ender de olsa bazı olgularda polioensefalomalasi tanımlanmıştır (Cardoso ve ark 2007, Cardoso 2010a). Çalışmada da beyinde makroskobik bir lezyon tanımlanmamış olmasına karşın, aynı virüs ailesinde yer alan BHV-1 virüs enfeksiyonunda da sıklıkla görülen mermede, burun ve sinus mukozasında hiperemi ve ödem, çalışma olgularının % 19,04'ünde kaydedilmiştir. Literatürlerde değinilmeyen, ancak çalışma olgularında (% 76,19) sıklıkla karşılaşılan, idrar keselerinin aşırı şişkinliği ile karakterize idrar retensiyonu çarpıcı bir bulgu olarak kaydedilmiştir. İdrar retensiyonu, medulla spinalis kök sinirlerinde yoğun viral antijen pozitifliğin görülmesi dikkate alındığında, idrar kesesini innerve eden kök sinirlerinin BHV-5 ile direkt hasar görme olasılığını düşündürmüştür.

Merkezi sinir sisteminin histopatolojik incelemesinde, literatürlerde de en sıklıkla tanımlanan (Asbaugh ve ark 1997, Chowdry ve ark 1997, Silva ve ark 1999, Perez ve ark 2002, Cardoso ve ark 2010b), şiddeti olgulara göre ve bölgelere göre değişkenlik gösteren meningoensefalitis bulguları ile karşılaşılmıştır. Bu bulgulardan belirgin olduğu belirtilen lezyonlar olan kanama, meningitis ve perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonları çalışma olgularında da tanımlanmıştır (Asbaugh ve ark 1997, Perez ve ark 2002, Cardoso ve ark 2010b). Önceki çalışmalarda sıklıkla belirtilen meningitis (Chowdry ve ark 1997, Silva ve ark 1999) çalışma olgularının yalnızca %23,80'inde kaydedilmiştir. Diğer yandan perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonunun dağılımı ve şiddeti olgulara göre önemli değişkenlikler göstermiş, genel olarak dağılım ve şiddet bakımından düşük seviyede görülmüştür. Bu durum enfekte hayvanların erken dönemde ölmeleri ya da ötanazi edilmeleri

ile ilişkilendirilmiştir. Diğer ensefalitis bulgularından fokal ya da diffuz glial hücre proliferasyonları olguların büyük çoğunluğunda beyinin tüm bölümlerinde görülmüştür. Glial hücreler ve nöronlarda, ender gözlenen inklüzyon cisimcikleri (d'Offay ve ark 1995, Cardoso ve ark 2010a, Pedraza 2010), çalışma olgularının hiçbirinde dikkati çekmemiştir. Diğer yandan çalışma olgularının çoğunda başta beyin kökü, medulla spinalis ve serebellumda dikkati çeken nöron dejenerasyonu, nekroz ve satellitozis, diğer araştırmacılar tarafından da sıklıkla kaydedilmiştir (Chowdry ve ark 1997, Silva ve ark 1999, Perez ve ark 2002, Cardoso ve ark 2010a).

Hastalığın patogenezisinde, BHV-5 solunum yolu ile ilk önce burun mukozası epitellerinde tutunur ve rinitise yol açar (Thiry ve ark 2006). Daha sonra virüs olfaktor ve/veya trigeminal sinirlerin intraaksonal transport mekanizmasıyla MSS'de özellikle pons ve serebral korteks nöronlarına tutunur. Virüs buradaki nöronlarda replike olur ve sinir uzanımları boyunca beyinin diğer bölümlerine yayılır (Lee ve ark 1999). Sunulan çalışma olgularında, viral antijen pozitif reaksiyonlar virüsün olfaktor sinir ile yayılımı ile ilişkili olarak en yoğun şekilde serebral hemisfer korteksindeki nöronlarda ve glial hücrelerde dikkati çekmiştir. Bununla birlikte, doğal ve deneysel olgulardan farklı olarak (d'Offray ve ark 1995, Meyer ve ark 1996, Vogel ve ark 2003, Machado ve ark 2013), bu bölgede substansiya albada da glial hücrelerde ve nöropilde güçlü immunreaksiyonlar saptanmıştır. Diğer yandan, viral antijen pozitifliğin en yoğun olduğu bölgelerden diğerini de beyin kökünde pons ve medulla oblongata oluşturmuştur. Daha önceki doğal ve deneysel çalışmalarda beyin kökünde virüs tutulumunun serebral kortekse nazaran düşük seviyede kaldığı belirtilmektedir. Bu nedenle de virüsün beyine geçişinde beyin kökü ile ilişkili trigeminal sinirin olfaktor sinire nazaran daha düşük etkiye sahip olduğu vurgulanmıştır (Meyer ve ark 1996, Lee ve ark 1999, Vogel ve ark 2003). Ancak sunulan çalışma olgularında beyin kökünde özellikle de pons ve medulla oblongatadaki nöronlar ve glial hücrelerde viral antijen tutulumunun serebral hemisferler düzeyinde olduğu belirlenmiştir. Bu veri çalışma olgularında virüsün MSS'ne yayılımında trigeminal sinirlerin de önemli derecede katkıda bulunabileceğini düşündürmüştür. Çalışma olgularında serebellum ve medulla spinalisteki immunopozitif reaksiyonların şiddeti, diğer araştırmacıların kaydettikleri gibi (Vogel ve ark 2003, Machado ve ark 2013), serebral hemisferlere ve beyin köküne nazaran daha düşük şiddette belirlenmiştir. MSS'ne genel bir bakışta; viral antijen reaksiyonların lokalizasyonları göz önünde bulundurulduğunda, BHV-5 MSS'deki replikasyon ve yayılımını nöronlar,

glial hücreler ve bunların uzantıları ile gerçekleştirdiği görülmektedir. Buna karşın daha önceki çalışmalarda virüs replikasyonu ve yayılımının ağırlıklı olarak nöronlar aracılığı olduğu vurgulanmıştır. Sunulan çalışmadaki bu farklılık çalışma olgularını etkileyen BHV-5 suşunun subtipi ve patojenitesi ile ilişkilendirilebilir. Diğer yandan, immunpozitif reaksiyonların çalışma olgularının medulla spinalis dorsal kök gangliyonlarında ve kök sinir uzantılarında yoğun pozitif reaksiyonların varlığı; BHV-5'in MSS'den periferik sinirlere de yayılım gösterebileceğini ortaya koymuştur. Bununla ilişkili olarak, nekropside karşılaşılan idrar kesesinin aşırı şişkinliği ile karakterize idrar retensiyonu; idrar kesesi sifinkteri ya da kaslarını uyaran sempatik ve parasempatik sinirlerin direkt virüs ilişkili hasarı ile bağdaştırılabilir. BHV-5 ilişkili periferik sinir hasarı hastalığının patogeneziinde önemli rol oynadığı düşünülmekle birlikte, detaylı veriler için ilave çalışmalara gereksinim vardır.

Apoptosis, enfekte hücrelerin viral etkenlere karşı geliştirdiği doğal (innate) immunitenin önemli bir savunma mekanizmasıdır (Cohen ve ark 1992, Everett ve McFadden 1999). Enfekte olan konak hücrelerin apoptotik ölümleri, henüz adaptif immunité şekillenmeden, viral replikasyonun engellenerek dokularda yeterli titrede virüs replikasyonunun gerçekleşmeksizin enfeksiyonun doğal immunité ile karşı konulması kaçınılmaz bir yoldur (Everett ve McFadden 1999). Ancak, evrim sürecinde çoğu virüs bu hücrel savunma bariyerine aşmak ve enfekte konakçı hücrenin apoptotik ölümüne engel olmak için çeşitli stratejiler geliştirmişlerdir (Koyama ve ark 2000; Thomson 2001, Gewies 2003, Koyama ve ark 2003, Lagunoff ve Carroll 2003).

Sunulan çalışma olgularında DNA kırılmalarını işaret eden TUNEL pozitif reaksiyonlar, BHV-5 antijen pozitif reaksiyonların MSS'deki bölgesel ve hücrel lokalizasyonları ile benzer dağılım göstermiştir. BHV-5 viral antijen pozitiflik ile TUNEL reaksiyonların aynı sahalardaki nöronlar ve glial hücrelerde belirlenmesi; enfekte hücrelerde virüs ilişkili apoptosisin indüklendiği sonucuna varılmıştır. MSS'de BHV-5 ve TUNEL reaksiyon ilişkisini ele alan *in vivo* herhangi bir çalışmaya rastlanılmamış, ancak BHV-5 ile enfekte *in vitro* çalışmalarda enfekte kültürlerdeki hücrelerde apoptosisin minimal düzeyde indüklendiği TUNEL yöntem ile gösterilmiş; bu sonuçla da virüsün antiapoptotik bir mekanizmaya sahip olabileceği kanısını uyandırmıştır (Silva-Frade ve ark 2010). Diğer taraftan ise, BHV-5 ile aynı ailede yer alan BHV-1 virüsü ile enfekte edilen hücre kültürlerinde ise, enfekte nöronlarda apoptosisin indüklendiği ortaya konmuştur. Aynı çalışmada enfek-

siyonda kullanılan virüsün DNA'sında hasar oluşturulduktan sonra nöronlar enfekte edildiğinde TUNEL pozitif reaksiyon elde edilemediği görülmüş ve apoptozisin şekillenmesi için viral replikasyonunun gerekliliği vurgulanmıştır (Xu ve ark 2012). *In vitro* çalışmaların tersine, sunulan çalışmada doğal enfekte buzağuların MSS'de BHV-5 enfekte nöronlar ve glial hücrelerde yaygın TUNEL pozitif reaksiyonların görülmesi; *in vivo* koşullarda apoptotik hücre ölümünün tamamen farklı bir seyir gösterebileceğini ortaya koymuştur.

Apoptozis memelilerde ölüm sinyalinin kaynağına bağlı; mitokondri aracılı içsel (intrinsik) ve ölüm reseptör aracılı dışsal (ekstrinsik) yollarla gerçekleşir (Everett ve McFadden 1999, Koyama ve ark 2003, Boya ve ark 2004). Buna ilaveten apoptozis endoplazmik retikulum stres yoluyla da indüklenebilmektedir (Everett ve Mc Fadden ark 1999). İçsel yolun temel bileşenleri (basitten komplekse kadar) tüm ökaryotik türlerde korunur (Boya ve ark 2004). Sonuç olarak hem içsel hem de dışsal yollarla gelişen apoptozis, novoprotein sentezi eksikliğinde çok hızlı bir şekilde indüklenir (Green ve Kroemer 1998). Bazı virüsler apoptozisi dışsal yolla indükledikleri bildirilse de, çoğunun temelde kullandığı mekanizma içsel yoldur (Koyama ve ark 2003). Mitokondri, içsel yol ile tetiklenen apoptozis sürecinde anahtar rol oynar (Green ve Kroemer 1998). Mitokondri membran permeabilitesi Bcl-2 protein ailesi tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir (Henderson ve ark 1991, Rao ve ark 1992, Nagata 1997, Cuconati ve White 2002). Mitokondrinin dış zarında oluşan bu geçirgenlik artışı apoptozis sürecindeki en önemli kritik devreyi oluşturmakta ve Bcl-2 protein ailesinde bulunan proapoptotik (Bax, Bim, Bid, Bak, Noxa) ve antiapoptotik (Bcl-2, Bcl_{XL}, Bcl-w) proteinlerin karşılıklı etkileşimleri ile yönetilmektedir (Henderson ve ark 1991, Rao ve ark 1992, Cuconati ve White 2002). Mitokondri membran geçirgenliğindeki bu dengesizlik, sitokrom c'nin sitoplazmaya geçişine neden olarak apoptotik süreci geri kritik bir devreye iter ve hücreyi ölüme sürükleyebilir (Boya ve ark 2004). Sağlıklı hücrelerde mitokondrilerin dış membranındaki Bcl-2 proteini Apaf-1 protein molekülüne bağlı olarak bulunur (Henderson ve ark 1991, Rao ve ark 1992, Cuconati ve White 2002). Hücre DNA'sında oluşan hasar Bcl-2 proteininin Apaf-1 molekülünden ayrılmasına neden olur (Henderson ve ark 1991). Böylece denge proapoptotik proteinlerin yönünde bozulur ve söz konusu proteinler mitokondrinin dış zarında porlar oluşturarak intermembranal boşluktaki proteinlerin sitoplazmaya kolayca geçişini sağlar (Cuconati ve White 2002). Bu proteinlerden en önemlisi sitokrom c olup, sitokrom c sitoplazmada monomerik Apaf-1 ile birleşerek bu proteinin yapısında değişikliğe yol açar (Everett ve McFadden 1999). Bu

bileşen ATP varlığında inaktif durumdaki kaspaz-9 enzimine bağlanır ve “apoptozom” adındaki kompleks bir yapıya dönüşür (Green ve Kroemer 1998). Apoptozom da prokaspaz-9’u proteolitik özellikteki aktif kaspaz-9’a dönüştürür. Aktif kaspaz-9 da kaspaz ailesindeki diğer inaktif kaspazları aktive eder (Green 2005). Bu kaspazlardan en önemlileri kaspaz-3 ve kaspaz-7’dir (Enari ve ark 1995). Bu enzimler hücredeki birçok yapıyı enzimatik olarak tahrip ederler ve apoptozisin sonlanmasında kilit rol üstlenirler.

Ölüm reseptörleri olarak da anılan Fas, TNF reseptörleri (TRAIL [TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand]-R1, TRAIL-R2, TNF-R1), DR3 ve DR6 hücre membranında bulunan integral proteinler apoptozisin dışsal yolla indüklenmesinde kilit rol oynarlar (Enari ve ark 1995, Green 2005). Bu reseptörlere FasL (CD95), TNF- α ve β gibi ölüm aktivatörlerinin bağlanması ile hücre zarında reseptör kompleksi oluşur bu reseptörler sitoplazmaya apoptotik sinyalleri iletirler (Enari ve ark 1995). Oluşan reseptör kompleksinin hücre içindeki uzantıları olan FADD, TRADD, prokaspaz-8 ve prokaspaz-2 gibi molekülleri bağlar ve oluşan yapı (DISC [Ölüme neden olan sinyal kompleksi]) kaspaz-8’i aktive eder (Cummings ve ark 1997). Kaspaz-8, kaspaz-9’a benzer bir mekanizma ile diğer kaspazları aktive eder ve sonuçta hücrenin ölümü ve fagositozu gerçekleşir. Örneğin, sitotoksik T-lenfositler ve doğal katil hücreleri virüs ile enfekte olmuş hücrelerin apoptotik ölümünü Fas reseptörlerin uyarımı aracılığı ile gerçekleştirir (Enari ve ark 1995). Görüldüğü üzere apoptozisin içsel ve dışsal yolları mitokondri noktasında kesişmektedir ve apoptozisin bundan sonraki aşamaları, kaspazların aktivasyonu gibi, her iki yolda da ortak-tır (Green ve Kroemer 1998, Green 2005).

Sunulan çalışmada BHV-5 ilişkili apoptozisin hangi yollar ile indüklendiğini ortaya koymak için yapılan immunohistokimyasal incelemeler sonucunda; MSS’de virüsün lokalize olduğu bölgelere göre değişen dağılımda ve şiddette aktif kaspaz-3, -8, -9 pozitif reaksiyonlar elde edilmiştir. Bu reaksiyonlar olguların geneli itibari ile değerlendirildiğinde, glia hücrelerinde ve daha az oranda da nöronlarda saptanmıştır. Sunulan çalışma olgularında, serebral hemisferlerde, serebellumda, beyin kökü ve medulla spinaliste içsel yolun belirteçlerinden aktif kaspaz-9’un en yüksek dağılım oranına sahip olduğu görülmüştür. Aktif kaspaz-9’u dışsal yolun belirteci olan aktif kaspaz-8 izlemiştir. İçsel ve dışsal yolların ortak belirteci aktif kaspaz-3 ise bunlara nazaran daha düşük oranda bulunmuştur. Olgular oranlandığında serebral hemisferler, serebellum, beyin kökü ve medulla spinaliste içsel yol

ve dışsal yol sırası ile; (%80,95; %61,90) oranlarında görülmüştür. Sunulan çalışmada, içsel ve dışsal apoptozis yollarının birlikte indüklendiği olgularda; aktif kaspaz-8 ve aktif kaspaz-9 immunreaksiyonların birlikteliği serebral hemisferlerde (% 42,85), serebellumda (% 33,33), beyin kökünde (% 47,61) ve medulla spinaliste (% 47,61) görülmüştür. Sunulan çalışmada bu veriler temelinde, MSS'de BHV-5 ilişkili apoptotik yollar ayrı indklenebil-diği gibi, içsel ve dışsal yolların her ikisi aracılı ile de tetiklenebilidiğini göstermiştir. n-ceki çalışmalarda, BHV-5 ilişkili apotozis yolaklarına yönelik herhangi *in vivo* ya da *in vitro* bir veriye rastlanmamış olup; BHV-5 ile %80 oranında nükleotid homoloğisi bulunan BHV-1 virüsü ile hücre kültürlerinde yapılan deneysel çalışmalarda (Silva-Frade ve ark 2010, Xu ve ark 2012), virüsün T lenfosit, B lenfosit ve monositlerde apoptozisi indüklediği (Hanon ve ark 1998a) ve bu mekanizmanın başlaması için virüsün hücre içine girmesine gerek olmadığı vurgulanmıştır (Hanon ve ark 1998b). Deneysel *in vitro* bir çalışmada BHV-1 virüsünün apoptozisi aktif kaspaz-8 aracılı dışsal yolun yanında, aktif kaspaz-9 aracılı içsel yol ile de indüklendiği ortaya konulmuştur (Xu ve ark 2012). Bu noktadan hareketle, sunulan çalışmada elde edilen BHV-5 ilişkili apoptozisin BHV-1 ile benzer ře-kilde hem içsel hem de dışsal yol ile indüklenebileceği ortaya konulmuştur.

Mitokondri, içsel yol ile tetiklenen apoptozis sürecinde anahtar rol oynar (Green ve Kroemer 1998, Green 2005). Mitokondri membran permeabilitesi, Bcl-2 protein ailesi tara-fından düzenlenir (Nagata 1997, Cuconati ve White 2002). Mitokondrinin dış zarındaki permeabilite artışı, apoptozis sürecindeki en kritik noktadır ve Bcl-2 protein ailesinde bu-lunan proapoptotik (Bax, Bim, Bid, Bak, Noxa) ve antiapoptotik (Bcl-2, Bcl_{XL}, Bcl-w) proteinlerin karşılıklı etkileşimleri ile yönetilmektedir (Henderson ve ark 1991, Cuconati ve White 2002). Etkileşimdeki olası dengesizlik sonucu mitokondri dış zarının geçirgenliği artar. Bu durum sitokrom c'nin sitoplazmaya geçişine neden olur ve apoptotik süreci geri dönüşümsüz bir devreye iter. Bu da hücrenin ölümden kaçışını olanaksız hale getirir (Boya ve ark 2004). Sunulan çalışmada, antiapoptotik belirteçlerden olan Bcl-2 proteinine yönelik immunreaksiyonlar MSS'de özellikle nöronlarda ve daha ender olarak da glial hücrelerde saptanmıştır. BHV-5 enfeksiyonununda nöronların apoptozise karşı gösterdiği direnç; en-feksiyonun devamlılığı ve latent enfeksiyonun kurulumunda önemli bir veri olarak değer-lendirilmiştir.

5. SONUÇ

Sığırlarda, özellikle buzağılarda nonpurulent meningoensefalitislere neden olan BHV-5 enfeksiyonu dünyanın farklı yerlerinde görülmektedir. Hastalık en çok Güney Amerika'dan (Arjantin, Brezilya, Kolombiya) bildirilmekle birlikte, Avustralya, Kuzey Amerika ve Avrupa'da da görüldüğü vurgulanmıştır (d'Offay ve ark 1995, Perez ve ark 2002, Cardoso ve ark 2007, Cardoso ve ark 2010a, Cardoso ve ark 2010b, Perdaza ve ark 2010, Maidana ve ark 2011). Amerika Birleşik Devletleri'nde sığır ensefalitisiyle ilişkilendirilen virüs; Avrupa'da sadece Macaristan'da izole edilmiş olup, Almanya ve Doğu Avrupa ülkelerinde de var olabileceği düşünülmektedir (d'Offay 1995, Cardoso ve ark 2007, Maidana ve ark 2011). Türkiye'de daha önce bildirilmeyen BHV-5 enfeksiyonu bu çalışmayla, yaşları 1 gün ile 5 ay arasında değişen doğal enfekte toplam 21 adet buzağıda incelenerek ortaya konmuştur. Ayrıca, araştırmada virüsün merkezi sinir sistemindeki yerleşimi ve dağılımı incelenerek, apoptozis mekanizması konakçı-virüs ilişkisi temelinde incelenmiştir. Elde edilen TUNEL pozitif reaksiyonlar ile virüsün merkezi sinir sisteminde nöronlarda ve glia hücrelerinde apoptozisi indüklediği ortaya konmuştur. Bununla birlikte, aktif kaspazlardan kaspaz-8 ve kaspaz-9'a karşı yapılan immunohistokimyasal incelemeler apoptozisin hem dışsal hem de içsel yol ile indüklendiğini ortaya koymuştur. Apoptozis ile ilişkili bulgular genel olarak değerlendirildiğinde, MSS'de BHV-5 ile enfekte alanlarda hem nöronlar hem de glial hücrelerde apoptozis indüklenmiştir. Bu da virüs eliminasyonunda doğal immun sistemin önemli bir yeri olan apoptozisin, hastalığın patogeneziinde önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte virüs enfekte sahalarda nöronların Bcl-2 ekspresyonu yolu ile apoptozise direnç göstermeleri, enfeksiyonun devamlılığında ve latent enfeksiyon kurulumunda önemli bir sonuç olarak değerlendirilmiştir.

ÖZET

Epikmen ET. Sığır herpesvirüs-5 ile doğal enfekte buzağılarda nöropatolojik bulgular ve virüsün apoptozis ile ilişkisi

BHV-5 (Bovine herpesvirus-5; Sığır herpesvirüs-5) sığırlarda ve özellikle de buzağılarda genellikle ölümcül nonprurulent meningoensefalitise neden olan *Herpesviridae* ailesinden *Alphaherpesvirinae* alt ailesinde yer alan *Varicellovirus* cinsinde sınıflandırılan viral patojendir. Bu çalışmada, merkezi sinir sisteminde (MSS) BHV-5 enfekte hücreler ile apoptozis arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Çalışmada, yaşları 1 gün ile 5 ay arasında değişen BHV-5 ile doğal enfekte toplam 21 adet buzağıda öncelikle klinik, makroskopik, histopatolojik bulgular tanımlandı. BHV-5 viral antijenin MSS’de dağılımı Avidin-Biotin Peroksidaz Kompleks (ABC) metot ile tesbit edildi. Enfekte dokularda apoptozise uğramış hücreler TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP Nick End-Labeling) metot ile belirlendi. Apoptotik yollar ise anti-aktif kaspaz-3,-8,-9 antikorları kullanarak ABC metot ile saptandı.

Klinik olarak; çene kaslarında kasılmalar, diş gıcırdatma, nistagmus ve opistotonus görüldü. Ayağa kalkamama, yatalak durum ile bacak kaslarında tremor, tetanik kasılmalar ve inkoordinasyon dikkat çekti. Nekropside, spesifik makroskopik bulgu görülmedi. MSS’nin histopatolojik incelemesinde, nöronlarda dejenerasyon ve nekroz, diffuz ya da fokal gliosis, perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonu, meningitis ve demyelinizasyon görüldü. BHV-5’e yönelik monoklonal antikor kullanılarak, ABC metot ile yapılan immunohistokimyasal incelemelerde; immunpozitif reaksiyonlar yoğunluk sırasına göre; beyin kökü, serebral hemisferler, medulla spinalis, ve serebellumda nöronlar ve glial hücrelerde belirlendi. MSS’de virüs enfekte hücreler ile apoptozis ilişkisini ortaya koymak için yapılan incelemelerde, DNA kırılmalarını işaret eden TUNEL pozitif reaksiyonlar genel olarak BHV-5 antijen pozitif immunreaksiyonların lokalize olduğu alanlardaki nöronlarda ve glial hücrelerde dağılım gösterdi. Bununla birlikte, apoptotik hücre ölüm yollarını belirlemek için yapılan immunohistokimyasal uygulamalarda nöronlarda ve glial hücrelerde saptanan kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9’a ilişkin pozitif reaksiyonlar; BHV-5 enfeksiyonunda MSS’de apoptozisin hem içsel hem de dışsal yolla indüklenebileceğini ortaya koydu. Diğer yandan, antiapoptotik belirteç olan Bcl-2 immunreaksiyonlarının özellikle nöronlarda görülmesi; BHV-5 enfekte nöronların, enfeksiyonun devamlılığında ve latent enfeksiyonunun kurulumunda önemli bir role sahip olabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar kelimeler: Apoptozis, sığır herpesvirüs-5 (BHV-5), kaspazlar, patoloji, TUNEL.

SUMMARY

Epikmen ET. Neuropathological findings of bovine herpesvirus-5 in naturally infected calves and its association with apoptosis.

BHV-5 (Bovine herpesvirus-5) is a viral pathogen that causes fatal nonpurulent meningoencephalitis especially in calves. The agent is a member of the *Alphaherpesvirinae* subfamily of *Herpesviridae* family and classified as a *Varicellovirus* genus.

In this study, a total of 21 calves (between 1 day to 5 months of age) were included and macroscopic, histopathologic, immunohistochemical findings were described. Immunohistochemical distributions of BHV-5 in viral antigen in the tissues of the central nervous system (CNS) were detected by Avidin-Biotin Peroxidase Complex (ABC) method. In the infected tissues, apoptotic cells were detected by TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP Nick End-Labeling) method. Apoptotic pathways were described by ABC method with anti-activated caspases-3,-8,-9 antibodies.

Clinical findings; contractions of jaw muscles, bruxism, nystagmus and opisthotonus were observed. Incoordination, inability to stand on legs, recumbency followed by tremors in leg muscles and tetanic contractions were noted. At necropsy, a specific macroscopic lesion was not seen. In histopathologic examination of the CNS, nonsuppurative encephalomyelitis was described, characterized by degeneration and necrosis, diffuse or focal gliosis, perivascular mononuclear cell infiltration, meningitis and demyelination. In the immunohistochemical examination, BHV-5, viral antigen was observed in the CNS as follows: brain stem, cerebral hemispheres, medulla spinalis were seen in the neurons of cerebellum and glial cells. TUNEL method showed that apoptotic cells were generally dispersed in glial and neuronal cells particularly in the areas of BHV-5 antigen immunopositive reactions of the CNS. The immunopositive reactions of activated caspase-3,-8,-9 detected in glial and neuronal cells indicated that apoptosis was induced by both intrinsic and extrinsic pathways. On the other hand, Bcl-2 (an anti-apoptotic marker) immunoreactions especially in the neurons and lesser extent glial cells indicated that BHV-5 infected neurons could have an important role in permanency of infection and establishment of latent infection.

Key words: Apoptosis, bovine herpesvirus-5 (BHV-5), caspases, pathology, TUNEL.

KAYNAKLAR

Ackermann M, Peterhans E, Wyler R. DNA of bovine herpesvirus 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves, American Journal of Veterinary Research 1982; 43: 36-40.

Alcami A, Koszinowski UH. Viral mechanisms of immune evasions. Immunology Today 2000; 21:447-455.

Alles A, Alley K, Barrett JC. Apoptosis: a general comment. Principles and Practice of Oncology 1994; 1:1-13.

Ameisen JC, Capron A. Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. Immunology Today 1991; 12(4):102-105.

Asbaugh SE, Thompson KE, Belknap EB, Patricia C. Schultheiss, Chowdhury S, Collins JK. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 1997; 9:387-394.

Aubert M, Blaho JA. Modulation of apoptosis during herpes simplex virus infection in human cells. Microbes and Infection 2001; 3: 859-866.

Babuik LA, Hurk DL, Tikoo SK. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. Veterinary Microbiology 1996; 53: 31-42.

Baines JD, Roizman B. The open reading frames UL3, UL4, UL10, and UL16 are dispensable for the replication of herpes simplex virus 1 in cell culture. Journal of Virology 1991; 65: 938-944.

Baringer JR, Pisani P. Herpes simplex virus genomes in human nervous system tissue analyzed by polymerase chain reaction. *Annals of Neurology* 1994; 36: 823–829.

Barker IK, Dreumel AAV, Palmer N. The alimentary system, Jubb KVF, Kennedy PC and Palmer N (eds), *Pathology of Domestic Ruminants*, Academic press 4th edition 1993; pp: 162-163, London.

Behnia M, Robertson KA, Martin WJ. Lung infections: role of apoptosis in host defense and patogenesis of disease. *Chest* 2000; 117:1771-7.

Benedict CA, Norris PS, Ware CF. To kill or be killed: viral evasion of apoptosis. *Nature Immunology* 2002; 3: 1013-1018.

Belknap EB, Collins JK, Ayers VK, Schulthesis PC. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 5 (BHV-5), *Veterinary Pathology*, 1994; 31:358-365.

Boelaert F, Speybroeck N, de Kruif A, Burzykowski T, Molenberghs G, Berkven DL. Risk factors for bovine herpesvirus-1 seropositivity. *Preventive Veterinary Medicine* 2005; 69:285–295.

Boya P, Pauleau AL, Poncet D, Gonzalez-Polo RA, Zamzami N, Kroemer G. Viral proteins targeting mitochondria: Controlling cell death. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004; 1659(2-3):178-189.

Brum MCS, Weiblen R, Flores EF, Chowdhury SI. Construcion and growth properties of bovine herpesvirüs type 5 recombinants defective in the glicoprotein E or thymidine kinase gene or both. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2010; 43: 217-224.

Cardoso CT, Ferrari HF, Cecilia MR, Arns L, Arns C. Bio-safety technology in production of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) using an alternative serum free-medium. *American Biochemistry and Biotechnology* 2007; 3(3): 125-130.

Cardoso CT, Ferrari HF, Garcia AF, Bregano LC, Andrade AL, Nogueira AHC. Immunohistochemical approach to the pathogenesis of clinical cases of bovine herpesvirus type 5 infections. *Diagnostic Pathology* (2010a) 5: 57.

Cardoso CT, Gomes DE, Ferrari HF, Silva-Frade C, Rosa ACG, Andrade AL, Luvizotto MCR. A novel in situ polymerase chain reaction hybridisation assay for the direct detection of bovine herpesvirus type 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Journal of Virological Methods* (2010b); 163: 509-512.

Caron L, Flores EF, Weiblen R, Scherer CFC, Irigoyen LF, Roehe PM, Odeon A, Sur JH. Latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. *Veterinary Microbiology* (2002); 84: 285-295.

Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *The Lancet* 1993; 341:1251-4.

Carter GR, Wise DJ, Flores EF. (2006) A concise review of veterinary virology. International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), Last updated: 9-May-2006, A3411.0506.

Cascio KE, Belknap EB, Schultheiss PC, Ames AD, Collins KJ. Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1999; 11: 134-139.

Clem RJ, Miller LK. Apoptosis reduces both the in vitro replication and the in vivo infectivity of a baculovirus. *Journal of Virology* 1993; 67:3730-3738.

Clem RJ, Miller LK. Apoptosis II: The molecular basis of apoptosis in disease. In L.D. Tomei and F.O. Cope, (Eds.), New York: Cold Spring Harbor Laboratory 1994; 89-110.

Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annual Review of Immunology* 1992; 10:267-293.

Cohen JJ. Apoptosis. to be or not to be. *Postgraduate Syllabus (AAAA-I)*, 1998; 1:1-19.

Cooper GM. Programmed cell death. The cell. Chapter 14. Washington: ASM Pres 1994; 592-6.

Cuconati A, White E. Viral homologs of Bcl-2: role of apoptosis in the regulation of virus infection. Genes and Development 2002; 16: 2465-2478.

Cummings MC, Winterfold CM, Walker NI. Apoptosis. The American Journal of Surgical Pathology 1997; 21:88-101.

Chowdhury SI. Molecular basis of antigenic variation between the glycoproteins C of respiratory bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurovirulent BHV-5. Virology 1995; 213:558-568.

Chowdhury SI, Lee BJ, Mosier D, Sur JH, Osorio FA, Kennedy G, Weiss ML. Neuropathology of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) meningo-encephalitis in a rabbit seizure model. Journal of Comparative Pathology 1997; 117:295-310.

Chowdhury SI, Onderci M, Bhattacharjee PS, Al-Mubarak A, Weiss ML, Zhou Y. Bovine herpesvirus 5 (BHV-5) Us9 is essential for BHV-5 neuropathogenesis. Journal of Virology 2002; 76:3839-3851.

Chowdhury SI, Lee BJ, Ozkul A, Weiss WL. Bovine herpesvirus 5 glycoprotein E is important neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit. Journal of Virology 2000; 74:5,2094-2106

Culling, CFA, Allison RT, Barr WT. Cellular pathology technique. 4th eds, Butterworth & Co. Ltd., London. 1985; 278-288.

Daniels PW, Sudarisman R, Purnomo R. Malignant catarrhal fever in asian livestock, Australian Centre for International Agricultural Research Monograph 1988; No:7,p129, Canberra.

David N, Hübner SO, Riet-Correa F, Halfen D, Lemos RA. Reactivation of latent bovine herpesvirus type 5 in cattle with polioencephalomalacia induced by ammonium sulphate. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 2007; 27(10):435-441.

Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E. The order herpesvirales, *Archives of Virology* 2009; 154: 171-177.

Delhon G, Moraes MP, Lu Z, Afonso CL, Flores EF, Weiblen R, Kutish GF, Rock DL. Genome of bovine herpesvirus 5. *Journal of Virology* 2003; 77(19):10339-10347.

d'Offay JM, Ely RW, Baldwin CW. Diagnosis of encephalitic bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) infection in cattle: virus isolation and immunohistochemical detection of antigen in formalin-fixed bovine brain tissues. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1995; 7:247-251.

Douglas RG, Reid PB, Thomas GC. Apoptosis and cancer. *Principles and practice of oncology* 1994;1:1-13.

Ely RW, d'Offay JM, Ruefer AH, Cash CY. Bovine herpesviral encephalitis: a retrospective study on archived formaline-fixed, parafin-embedded brain tissue. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1996; 8:487.

Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 2007; 35:495-516.

Enari M, Hug H, Nagata S. Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature* 1995; 375:78-81.

Engelhardt T, Keil GM. Identification and characterization of the bovine herpesvirus 5 US4 gene and gene product, *Virology* 1996; 225:126-135.

Erdoğan BB, Uzaslan EK. Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde Fas-FasL bağımlı apoptozis. *Akciğer Arşivi* 2003; 4:165-174.

Everett H, McFadden G. Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends in Microbiology* 1999; 7(4):160-165.

Gagliardini V, Fernandez PA, Lee RKK. Prevention of vertebrate neuronal death by the crmA gene. *Science* 1994; 263:826.

Gewies A. Introduction to Apoptosis. *ApoReview* 2003,1-26.

Green DR, Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends in Cell Biology* 1998; 8:267-271.

Green DR. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 2005; 121: 671-674.

Ferri KF, Kroemer GK. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nature Cell Biology* 2001; 3:E255-E265.

Fukumori T, Akari H, Iida S, Hata S, Kagawa S, Aida Y, Koyama AH, Adachi A. The HIV-1 Vpr displays strong anti-apoptotic activity. *Federation of European Biochemical Societies* 1998; 432:17-20.

Hanon E, Lambot M, Hoornaert S, Lyaku J, Pastoret P. Bovine herpesvirus 1-induced apoptosis: phenotypic characterization of susceptible peripheral blood mononuclear cells. *Archives of Virology* (1998a); 143:441-452.

Hanon E, Meyer G, Vanderplasschen A, Dessy-Doizé C, Thiry E, Pastoret PP. Attachment but not penetration of bovine herpesvirus 1 is necessary to induce apoptosis in target cells. *Journal of Virology* (1998b); 72:7638-7641

Henderson S, Rowe M, Gregory C. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects B cells from programmed cell death. *Cell* 1991; 65: 1107-1115.

Heylbroeck C, Balachandran S, Servant MJ, DeLuca C, Barber GN, Lin R, Hiscott J. The IRF-3 transcription factor mediates sendai virus-induced apoptosis. *Journal of Virology* 2000; 74(8): 3781-92.

Irie H, Koyama H, Kubo H, Fukuda A, Aita K, Koike T, Yoshimura A, Yoshida T, Shiga J, Hill T. Role of apoptosis in virus infection, *Journal of General Virology* 1998; 79:1225-1231.

Jones CJ, Chowdhury S. A review of the biology of bovineherpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. *Animal Health Research Reviews* 2008; 8(2):187-205.

Kerr JFR, Harmon BV. In L.D. Tomei and Cope FO, (eds.). *Apoptosis: The molecular basis of cell death*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory 1991; pp. 5-29.

Kerr JFR, Winterfold CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73:2013-26.

King NW, Alroy J. Diseases caused by viruses, Jones TC, Hunt RD and King NW (eds), *Veterinary Pathology*, Williams & Wilkins 6th edition 1996; pp: 216-240, USA.

Kliefort R, Maalouf G, Stalis I, Terio K, Janssen D, Schrenzel M. Malignant catarrhal fever-like disease in barbary red deer (*cervus elaphus barbarus*) naturally infected with a virus resembling alcelaphine herpesvirus 2. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002; 40(9): 3381-3390.

Kopecky SA, Willingham MC, Lyles DS. Matrix protein and another viral component contribute to induction of apoptosis in cells infected with vesicular stomatitis virus. *Journal of Virology* 2001; 75:12169-12181.

Koyama AH. Induction of apoptotic DNA fragmentation by the infection of vesicular stomatitis virus. *Virus Research* 1995; 37(3):285-290.

Koyama AH, Adachi A. Induction of apoptosis by herpes simplex virus type 1. *Journal of General Virology* 1997; 78, 2909–2912.

Koyama AH, Miwa Y. Suppression of apoptotic DNA fragmentation in herpes simplex virus type 1-infected cells. *Journal of Virology* 1997; 71: 2567-2571.

Koyama AH, Akari H, Adachi A, Goshima F, Nishiyama Y. Induction of apoptosis in HEp-2 cells by infection with herpes simplex virus type 2. *Archives of Virology* 1998; 143:2435-2441.

Koyama AH, Arakawa T, Adachi A. Characterization of apoptosis induced by sorbitol: a unique system for the detection of antiapoptotic activities of viruses. *Microbes and Infection* 2000; 2(6): 599-606.

Koyama AH, Irie H, Ueno F, Ogawa M, Nomoto A, Adachi A. Suppression of apoptotic and necrotic cell death by poliovirus. *Journal of General Virology* 2001; 82:2965-2972.

Koyama AH, Adachi A, Irie H. Physiological significance of apoptosis during animal virus infection, *International Reviews of Immunology* 2003; 22:341–359.

Kurokawa M, Koyama AH, Yasuoka S, Adachi A. Influenza virus overcomes apoptosis by rapid multiplication. *International Journal of Molecular Medicine* 1999; 3:527-530.

Kültürsay H, Kayıkçıoğlu M. Apoptozis ve kardiyovasküler hastalıklar. *Anadolu Kardiyoloji Dergisi* 2002; 2(4):323-9.

Lagunoff M, Carrol PA. Inhibition of apoptosis by the c-herpesviruses. *International reviews of immunology* 2003; 22:373-399.

Lawrence SY, Christopher WD, Aristides GE. Viruses and apoptosis. *Bntah Medical Bulletin* 1997; 53:509-521.

Lee JB, Weiss LM, Mosier D, Chowdhury IS. Spread of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in the rabbit brain after intranasal inoculation. *Journal of NeuroVirology* 1999; 5: 474-484.

Liman A, Engels M, Meyer G, Ackermann M. Glycoprotein C of bovine herpesvirus 5 (BHV-5) confers a distinct heparin-binding phenotype to BHV-1. *Archives of Virology* 2000; 145:2047–2059.

Liston P, Fong WG, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis: there is more to life than bcl-2. *Oncogene* 2003; 22:8568-8580.

Los M, Van de Craen M, Penning LC. Requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/APO-1 mediated apoptosis. *Nature* 1995; 375: 81-83.

Machado GF, Bernardi F, Hosomi FYM, Peiro JR, Weiblen R, Roehe PM, Alessi AC, Melo GD, Ramos AT, Maiorka PC. Bovine herpesvirus 5 infection in a rabbit experimental model: immunohistochemical study of the cellular response in the CNS. *Microbial Pathogenesis* 2013; 57:10-16.

Mangan DF, Robertson B, Whal SM. II-4 Enhances programmed cell death (apoptosis) in stimulated human monocytes. *The Journal of Immunology* 1996; (148):1812-1816.

Mason RP. Effects of calcium channel blockers on cellular apoptosis, implications for carcinogenic potential. *Cancer* 1999; 85:2093-102.

Mayo MA. Changes to virus taxonomy 2005. *Archives of Virology* 2005; 150:189-198.

Maidana SS, Ladelfa MF, Pérez SE, Lomónaco PM, Zajac MPDM, Odeón A, Viera JB, Combessies G, Fondevila N, Palacios M, Thiry J, Muylkens B, Thiry E, Romera SA. Characterization of BoHV-5 field strains circulation and report of transient specific subtype of bovine herpesvirus 5 in Argentina BMC Veterinary Research 2011; 7:8.

Meyaard L, Otto SA, Keet IP, Roos MT, Miedema F. Programmed death of T-cells in human immunodeficiency virus infection: no correlation with progression to disease. Journal of Clinical Investigation 1994; 93:982-988.

Meyer G, Lemaire M, Lyaku J, Patoret PP, Thiry E. Establishment of a rabbit model for bovine herpesvirus type 5 neurological acute infection. Veterinary Microbiology 1996; 51:27-40.

Meyer G, Bare O, Thiry E. Identification and characterization of bovine herpesvirus type 5 glycoprotein H gene and gene products. Journal of General Virology 1999; 80: 2849-2859.

Muylkens B, Thiry J, Kirten P, Schynts F, Thiry E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. Veterinary Research 2007; 38:181-209.

Nagata S. Apoptosis by death factor. Cell 1997; 88:355-65.

Nandi S, Kumar M, Manohar M, Chauhan RS. Bovine herpes virus infections in cattle. Animal Health Research Reviews 2009; 10(1):85-98.

Narita M, Inui S, Murakami Y, Namba K, Shimizu Y. Pathological changes in young and adult cattle after intranasal inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus. Journal of Comparative Pathology 1982; 92: 41-49.

Narula J, Kharbanda S, Khaw BA. Apoptosis and the heart. Chest 1997; 112:1358-62.

Ozansoy M, Başak AN. Parkinson hastalığında programlanmış hücre ölümü. Parkinson Hastalığı ve Hareket Bozukluğu Dergisi 2002; 9(1):54-61.

Öniz H. Apoptozis: ölmeye yatmak. SSK Tepecik Hastanesi Dergisi 2004; 14(1):1-20.

Özdamar K. SPSS ile Biyoistatistik 9. Baskı 2013 nisan kitabevi.

Öztürk F. Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002; 9(2):143-148.

Pedraza FJ, Antonio C Alessi, Edel F Barbosa-Stancioli. Detection of herpesvirus 5 (BoHV-5) in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine brain by nested PCR in Colombian cattle. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 2010; 23:3

Peshev R, Christensen L, Christova L. Comparative molecular epidemiological investigation on different bovine herpes viruses. Comparative Immunology. Microbiology & Infectious Diseases 1998; 21:247-255.

Perez SE, Bretschneider G, Leunda MR, Osorio FA, Flores EF, Odeón AC. Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. Veterinary Pathology 2002; 39:437-444.

Pidler S, Logan J, Shenk T. Deletion of the gene encoding the adenovirus 5 early region 1B 21,000-molecular weight polypeptide leads to degradation of viral and host cell DNA. Journal of Virology 1984; 52:664-671.

Rao L, Debbas M, Sabbatini P, Hockenbery D, Korsmeyer S, White E. The adenovirus E1A proteins induce apoptosis which is inhibited by the E1B 19K and Bcl-2 proteins, Proceedings of the National Academy of Science USA 1992; 89:7742-7746.

Ray CA, Black RA, Kronheim SR. Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 β converting enzyme. Cell 1992; 69:597-604.

Redaelli M, Mucignat-Caretta C, Cavaggioni A, Caretta A, D'Avella D, Denaro L, Cavirani S, Donofrio G. Bovine herpesvirus 4 based vector as a potential oncolytic-virus for treatment of glioma. Virology Journal 2010; 7: 298.

Reed JC. Bcl-2 and the regulation of cell death. The Journal of Cell Biology 1994;124:1-6.

Roy N, Mahadevan MS, McLean M. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 1995; 80:167-178.

Roizman B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson AC, Studdert MJ. The family Herpesviridae: an update. *Archives of Virology* 1992; 123:425-449.

Roizman B, Sears AE. *Herpes simplex viruses and their replication*, Fields BN, Knipe DM and Howley PM (eds), *Fields Virology*, Lippincott-Raven 2001; pp:72:2399-2459, Philadelphia.

Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Annals of Diagnostic Pathology* 1982; 17:229-59.

Sgonc R, Wick G. Methods for the detection of apoptosis. *International Archives of Allergy and Immunology* 1994; 105:327.

Sheehan D, Hrapchak B. (1980) *Theory and practice of Histotechnology*, 2nd ed, 1980, pp262-264, Battelle Press, Ohio.

Silva A, Weiblen R, Irigoyen L, Roehle P, Sur H, Osorio F, Flores E. Experimental infection of sheep with bovine herpesvirus type-5 (BHV-5): acute and latent infection. *Veterinary Microbiology* 1999; 66:89-99.

Silva-Frade C, Martins Júnior A, Borsanelli AC, Cardoso TC. Effects of bovine Herpesvirus type 5 on development of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology* 2010, 73: 324-331

Silva SC, Brum MCS, Weiblen R, Flores EF, Chowdhury SI. A bovine herpesvirus 5 recombinant defective in the thymidine kinase (TK) gene and a double mutant lacking TK and the glycoprotein E gene are fully attenuated for rabbits. *The Brazil Journal of Medical and Biological Research* 2010; 43(2):150-159.

Steiner F, Zumsteg A, Vogt B, Ackermann M, Schwyzer M. Bovine herpesvirus 5 BICP0 complements the bovine herpesvirus 1 homolog. *Veterinary Microbiology* 2010; 143(1):37-44.

Thiry J, Keuser V, Muylkens B, Meurens F, Gogev S, Vanderplasschen A, Thiry E. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1, *Veterinary Research* 2006; 37:169-190.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267:1456-62.

Thomson U. Viruses and apoptosis. *International Journal of Experimental Pathology* 2001; 82(2):65.

Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*; 1998; 281:5381,1312-17.

Tolskaya EA, Romanova LI, Kolesnikova MS, Ivannikova TA, Smirnova EA, Raikhlin NT, Agol VI. Apoptosis-inducing and apoptosis-preventing functions of poliovirus. *Journal of Virology* 1995; 69:1181-1189.

Tornusciolo DR, Schmidt RE, Roth KA. Simultaneous detection of TdT mediated dUTP-biotin nick end labelling (TUNEL)-positive cells and multiple immunohistochemical markers in single tissue sections. *BioTechniques* 1995;19:800-805.

Vogel FSF, Caron L, Flores FE, Weiblen R, Winkelmann RE, Mayer SV, Bastos GR. Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. *Journal of Clinical microbiology* 2003; 45:4512-4520.

Walker PR, Kokileva L, LeBlanc J, Sikorska M. Detection of the initial stages of DNA fragmentation in apoptosis. *BioTechniques* 1993; 15:1032-1047.

Walker PR, Weaver VM, Lach B, LeBlanc J, Sikorska M. Endonuclease activities associated with high molecular weight and internucleosomal DNA fragmentation in apoptosis. *Experimental Cell Research* 1994; 213:100-106.

Wang KW. Calpain and caspase, can you tell the difference? Transactions on Nuclear Science 2000; 23-31.

Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections, Lancet 2001, 357:1513-8.

Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature 1980; 284:555-556.

Xu X, Zhang K, Huang Y, Ding L, Chen G, Zhang H, Tong D. Bovine herpesvirus type 1 induces apoptosis through Fas-dependent and mitochondria-controlled manner in Madin-Darby bovine kidney cells. Virology Journal 2012; 9:202.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim ve öğretimim süresince ilgi ve uyarıları ile beni yönlendiren, tezimin oluşturulmasında ve tezimin her aşamasında bilgi birikimini, tecrübelerini, görüş ve yardımlarını esirgemeyen, her türlü imkanı kullanmamı sağlayan danışmanım ve Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sayın Nihat TOPLU'ya; eğitimim süresince değerli görüş ve tecrübeleriyle bana ışık tutan Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Sayın Recai TUNCA'ya; tez izleme komitesi üyesi olarak vermiş olduğu destek ve katkılar için Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Sayın Mustafa SANDIKÇI'ya; yardım ve destekleri için Patoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Sayın Emrah İPEK'e; tezimin yürütülmesi için gerekli mali desteği sağlayan Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na; lisansüstü eğitim-öğretim sürecinin sağlıklı bir şekilde yürütülmesinde emeği bulunan Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü akademik ve idari kadrosuna, her koşulda yanımda olan, desteklerini her zaman hissettiğim Anneme ve Babama teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

30.04.1982'de İzmir'de doğdum. İlkokul ve Ortaokul öğrenimimi Manisa'da, lise öğrenimimi Turgutlu Halil Kale Fen Lisesi'nde tamamladım. 2001 yılında girdiğim Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni 2006 yılında bitirerek Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Patoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğretimime başladım ve 2009 yılında mezun oldum. Aynı yıl Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi kadrosuna atanarak Doktora öğretimime başladım.