



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

**EKTİMA HASTALIĞINDA LEZYONLU BÖLGELERDE TLR-4,
HSP-70 VE KASPAZ-3 EKSPRESYONLARININ
İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Vet. Hek. Emine Nur DİNÇER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNERLİK PATOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**Danışman
Prof. Dr. Özlem ÖZMEN**

BURDUR-2025

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

**EKTİMA HASTALIĞINDA LEZYONLU BÖLGELERDE TLR-4,
HSP-70 VE KASPAZ-3 EKSPRESYONLARININ
İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Vet. Hek. Emine Nur DİNÇER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNERLİK PATOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Özlem ÖZMEN

Bu Araştırma “*Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü*” tarafından “1048-YL-24” proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR-2025

KABUL ve ONAY SAYFASI

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Emine Nur DİNÇER tarafından *Prof. Dr. Özlem ÖZMEN* yönetiminde hazırlanan “*Ektima Hastalığında Lezyonlu Bölgelerde TLR-4, HSP-70 ve Kaspaz-3 Ekspresyonlarının İmmunohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi*” başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Veteriner Patoloji Anabilim Dalında *Yüksek Lisans Tezi* olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 27.06.2025

Prof. Dr. M. Özgür ÖZYİĞİT
Bursa Uludağ Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Veterinerlik Patolojisi AD

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN
Burdur Mehmet Akif Ersoy
Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Veterinerlik Patolojisi AD
Jüri

Doç. Dr. Volkan İPEK
Burdur Mehmet Akif Ersoy
Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Veterinerlik Patolojisi AD
Jüri

ONAY

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

Prof. Dr. Ramazan ADANIR

Müdür

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmamın yürütülmesi sırasında, desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yol gösteren ve beni yüreklendiren, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım çok kıymetli danışman hocam sayın Prof. Dr. Özlem ÖZMEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince değerli bilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve tecrübelerini paylaşarak yön veren hocalarım; sayın Prof. Dr. Zafer ÖZYILDIZ'a, sayın Doç. Dr. Volkan İPEK'e ve Uzm. Biyolog Dilnur İLERİ'ye, ayrıca Patoloji Anabilim Dalı bünyesinde birlikte çalıştığım tüm yüksek lisans ve doktora arkadaşlarıma destekleri için teşekkür ederim. Tüm hayatım boyunca her daim yanımda ve en büyük desteğim olan aileme çok teşekkür ederim.

ETİK BEYAN

“Ektima Hastalığında Lezyonlu Bölgelerde TLR-4, HSP-70 ve Kaspaz-3 Ekspresyonlarının İmmunohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi” başlıklı tez çalışmamdaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Özlem ÖZMEN danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Emine Nur DİNÇER

Tarih:

İmza:

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ETİK BEYAN SAYFASI	iv
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
1.1.Genel Bilgiler	1
1.1.1. Ektima	3
1.1.2.Etiyoloji	4
1.1.3. Epizootiyoloji	4
1.1.4. Hastalığın Zoonotik Karakterizasyonu	6
1.1.5. İmmun Sistem İlişkisi	6
1.1.6. Patogenez	9
1.1.7. Klinik Bulgular	10
1.1.8. Teşhis	11
1.1.9. Nekropsi ve Histopatoloji	11
1.1.10. Ayırıcı Tanı	12
1.1.11. Coğrafi Dağılım ve Ekonomik Etki	13
1.1.12. Koruma ve Kontrol	14
1.2.1. Toll-benzeri Reseptör 4 (TLR-4)	16
1.2.2. TLR-4 ve Bağışıklık Sistemi Üzerindeki Rolü	18
1.2.3. TLR-4'ün Klinik ve Terapötik Hedef Olarak Önemi	18
1.2.4. TLR-4'ün Yapısı ve Lokalizasyonu	19
1.2.5. TLR-4'ün Sinyal İletim Mekanizmaları	19
1.2.6. Hücre Stresi, Nekroz ve Apoptozis	20
1.2.7. TLR-4 ve Hastalıklarla İlişkisi	20
1.2.7.1 Sepsis	21
1.2.7.2. Otoimmün Hastalıklar	21
1.2.7.3. Kanser	21
1.2.7.4. Viral Enfeksiyonlar	21
1.2.8. TLR-4 Hedefli Tedaviler ve Klinik Yaklaşımlar	21
1.3.1. HSP-70	22
1.3.2. HSP-70'in Hastalıklardaki Rolü ve İlişkili Yolaklar	22
1.3.3. HSP-70'in Konak Hücre Savunmasındaki Rolü	22
1.3.4. NF-κB Sinyal Yolağının Modülasyonu	23
1.3.5. DAMP Aktivitesi ve Bağışıklık Yanıtı	23
1.3.6. Chaperone-Mediated Autophagy (CMA)	23
1.3.7. Yara İyileşmesi ve Reepitelizasyon	23
1.3.8. HSP-70'in Moleküler Yapısı	25

1.3.9. HSP-70'in Fizyolojik Fonksiyonları	25
1.3.10. HSP-70 ve Klinik ve Terapötik Potansiyel	25
1.4.1. Kaspaz-3 ve Apoptoziste Merkezi Rol ve Klinik Önemi	25
1.4.2. Kaspaz-3'ün Üretimi ve Aktivasyonu	26
1.4.3. Kaspaz-3'ün Hastalıklardaki Rolü ve Yolakları	26
1.4.4. Kaspaz-3'ün Apoptozis Yolağındaki Temel Rolü	26
1.4.5. Doku Yenilenmesi ve Rejeneratif Rol	26
2. GEREÇ ve YÖNTEM	27
2.1.Histopatolojik Yöntem	27
2.2.İmmunohistokimya Metodu	30
2.3.İstatistik Analizler	32
3. BULGULAR	33
3.1.Makroskobik Bulgular	33
3.2.Mikroskobik Bulgular	41
3.3.İmmunohistokimyasal Bulgular	41
3.3.1. HSP-70 İmmunohistokimyasal Bulguları	41
3.3.2.TLR-4 İmmunohistokimyasal Bulguları	44
3.3.3. Kaspaz 3 İmmunohistokimyasal Bulguları	47
4. TARTIŞMA	52
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	71

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	HSP-70'in enfeksiyon patogenezindeki temel işlevsel yolları. Görsel yazar tarafından oluşturulmuştur; bilimsel içerik, Asea (2003), Binder (2004), Beere ve diğerleri (2000), Kaushik ve Cuervo (2012) ve Udono ve Srivastava (1993) uyarlanmıştır.	24
Şekil 3.1.	Ektimalı bir oğlağın ağız ve dildeki lezyonlarının makroskopik görünümü	33
Şekil 3.2.	Ektimalı keçilerde dudak ve mermesinde kabuklu proliferatif lezyonlar lezyonlarının makroskopik görünümü	34
Şekil 3.3.	Ektimalı başka keçilerde dudak ve mermesinde proliferatif lezyonlar lezyonlarının makroskopik görünümü	34
Şekil 3.4.	Ektimalı keçilerde dudak ve çene lezyonları ile kabuk uzaklaştırıldıktan sonraki görünümü	35
Şekil 3.5.	Çalışmadaki hayvanların lezyonlarının dağılımı	35
Şekil 3.6.	Çalışmadaki hayvanların yaşa göre dağılımı	36
Şekil 3.7.	Bir oğlaka dudakta şekillenmiş ektima olgusu olgusunun mikroskopik görünümü, belirgin epitelyamatöz hiperplazi (kalın oklar) ve ortokeratozis (ince oklar), HE, Bar= 200µm.	37
Şekil 3.8.	Yukarıdaki resmin büyütülmüş görüntüsü, lezyonlu bölgede yangısal hücre infiltrasyonları (ok), HE, Bar= 100µm.	37
Şekil 3.9.	Aynı alanını daha yakından görünümü, yangısal hücreler (kalın oklar), kanama odakları (ince ok) ve epitellerde balonumsu dejenerasyonlar (ok başları), HE, Bar= 50µm.	38
Şekil 3.10.	Bir oğlaktaki ektima olgusunun histopatolojik görünümü. (A) Tipik epitelyamatöz hiperplazi (kalın ok). (B) Belirgin ortokeratozis (ince ok) ve (C) tipik balonumsu dejenerasyona uğramış epitel hücreleri (ok başı), HE, Barlar A için 200µm, B için 100µm, C için 50µm.	38
Şekil 3.11.	Yukarıdaki olgunun büyütülmüş görünümü, intrasitoplazmik inklüzyon cisimcikleri (ok), HE, Bar= 50µm.	39
Şekil 3.12.	Bir başka oğlaktaki ektima olgusunda püstül oluşumu (ok), HE, Bar= 50µm.	39
Şekil 3.13.	Bir başka oğlaktaki lezyonlarda belirgin intrasitoplazmik inklüzyon cisimciklerinin (oklar) görünümü, HE, Bar= 50µm.	40
Şekil 3.14.	Bir ektima olgusunda lezyonun üzerinde kalın bir kabuk oluşumu, HE, Bar= 200µm.	40
Şekil 3.15.	Ektimalı bir oğlakta mezenkimal hücrelerde hafif şiddette HSP-70 ekspresyonları (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 50µm.	41
Şekil 3.16.	Bir başka ektima lezyonunda yangısal hücrelerde hafif şiddette HSP-70 ekspresyonları (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 50µm.	42
Şekil 3.17.	Ektima lezyonunda bir alandaki yangısal hücrelerde hafif şiddette HSP-70 ekspresyonları (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 50µm.	42
Şekil 3.18.	Yukarıdaki resmin yakından görünümü, yangı hücrelerinde	43

	ekspresyonlar (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 20µm.	
Şekil 3.19.	Lezyonlu alanlarda HSP-70 ekspresyon skorları ve eksprese eden hücre yüzdesi	43
Şekil 3.20.	Lezyonlu bölgede TLR-4 ekspresyonlarının görünümü, epitel ve mezenkimal hücrelerde belirgin pozitif reaksiyon (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 200µm.	44
Şekil 3.21.	Bir başka lezyonlu bölgede TLR-4 ekspresyonlarının görünümü, epitel ve mezenkimal hücrelerde belirgin pozitif reaksiyon (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 200µm.	45
Şekil 3.22.	Yukarıdaki resmin yakından görünümü epitel ve mezenkimal hücrelerde pozitif immuno reaksiyon (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 100µm.	45
Şekil 3.23.	Ortokeratotik hücreler ile yangısal hücrelerde belirgin ekspresyonlar (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 50µm.	46
Şekil 3.24.	Immunopozitif hücrelerin (oklar) büyütülmüş görünümü, Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 20µm.	46
Şekil 3.25.	Lezyonlu alanlarda TLR-4 ekspresyon skorları-ı ve eksprese eden hücre yüzdesi	47
Şekil 3.26.	Lezyonlu bölgede epitelial ve mezenkimal hücrelerde belirgin ekspresyonlar (oklar) Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 200µm.	48
Şekil 3.27.	Lezyonlu bölgede epidermisin bazal ve spinozum tabakalarındaki hücrelerinde belirgin ekspresyonlar (oklar) Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 200µm.	48
Şekil 3.28.	Bir başka alanda epidermisin bazal ve spinozum tabakalarındaki hücrelerde belirgin ekspresyonlar (oklar) Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 200µm.	49
Şekil 3.29.	Bir başka olguda epitel ve mezenkimal hücrelerde pozitif immunoekspresyonlar (oklar) Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 50µm.	49
Şekil 3.30.	Epitelial ve mezenkimal hücrelerde belirgin ekspresyonlar (oklar) Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 50µm.	50
Şekil 3.31.	Epidermisin spinozum hücrelerinde belirgin ekspresyonlar (oklar) Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 200µm.	50
Şekil 3.32.	Yukarıdaki alanın büyütülmüş görünümü ve stratum spinozum tabakasındaki hücrelerde belirgin ekspresyonlar (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 200µm.	51
Şekil 3.33.	Lezyonlu alanlarda kaspaz-3 ekspresyon skorları ve eksprese eden hücre yüzdesi	51

TABLÖLAR

Tablo 2.1.	TLR-4'ün Enfeksiyonlardaki Etki Mekanizmaları	20
Tablo 2.2	Hastalıklarda HSP-70'in Etki Mekanizmaları	24
Tablo 2.3	Kaspaz-3'ün Hastalıklarda Etki Mekanizmaları	27



SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Derece Santigrat
®	Tescilli Marka
™	Ticari Marka
ABD	Amerika Birleşik Devleti
AGID	Agar Jel Immunodiffusion
BTv	Bluetongue Virus
CaPV	Capripoxvirus
CD4	Cluster Of Differentiation-4
CD8	Cluster Of Differentiation-8
DC	Dendritik Cell
DNA	Deoksi ribo Nükleik Asit
dsDNA	double stranded Deoksi Ribonükleik Asit
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FMD	Food And Mouth Disease
GM-CSF	Granülosit Makrofaj-Koloni Stimulan Faktör
IFN	İnterferon
IFN-γ	İnterferon-Gamma
IL-1	İnterlökin-1
IL-2	İnterlökin-2
IL-8	İnterlökin-8
IL-10	İnterlökin-10
IF	İmmunofloresan
MHC-II	Major Histocompatibility Complex-2
nm	Nanometre
OIE	Office Internationale des Epizooties
ORFV	Orf Virus
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPV	Parapoxvirus
SN	Serum Nötralizasyon
SPF	Spesifik Patojen Free
TNF-α	Tumour Necrosis Factor-Alfa
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ÖZET

Ektima Hastalığında Lezyonlu Bölgelerde TLR-4, HSP-70 ve Kaspaz-3 Ekspresyonlarının İmmunohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi

Bulaşıcı Ektima (ORF), koyun, keçi ve yabani küçük ruminantlarda görülen Poxviridae ailesinden bir parapoxvirusun (ORFV) oluşturduğu ekonomik önemi büyük bir hastalıktır. Ağız çevresi, dil, dudak ve burun deliği çevresinde sert kabuklu yaralar ile karakterizedir. Özellikle 1 yaş altı gruptaki hayvanlar enfekte olmakta, ancak en sık 3-4 aylık hayvanları etkilemektedir. İmmun yetmezliği olan yavru hayvanlarda mortalite %100'e yakın seyretmektedir. Etrafa saçılan virus aylarca hatta yıllarca canlılığını korumaktadır. Ağızda oluşan yaralar nedeniyle yavru yeterince beslenemezler. Bu sebeple ektima ölümlere ve önemli verim kayıplarına neden olmaktadır. Virus epitelyotropiktir ve epidermal keratinositlerde çoğalmaktadır. Keratinositler organizmayı korumakla görevli olmasına rağmen ORFV bu savunmadan rahatlıkla kaçınabilmektedir. Toll-like reseptör 4 (TLR-4), heat shock protein -70 (HSP-70) ve Kaspaz-3, hücrel stres, inflamasyon ve apoptoz süreçlerinde kritik roller üstlenen moleküllerdir ve enfeksiyöz hastalıklarda önemli olabilecekleri düşünülmektedir. Bu çalışmanın amacı TLR-4, HSP-70 ve Kaspaz-3'ün ektima hastalığında lezyonlu dokulardaki ekspresyonlarının incelemesidir. Bu amaçla 37 adet ektima lezyonu histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak incelenmiştir. Her üç belirtecin de lezyonlu alanlarda hem epitel hem de yangısal hücrelerde arttığı gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları TLR-4, HSP-70 ve Kaspaz-3'ün ektima patojenezinde önemli rol oynadığını ve ileride teşhis ve tedavi amacıyla kullanılabileceğini göstermiştir. Bu konuda daha ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Ektima, TLR-4, HSP-70, Kaspaz-3, IHC

ABSTRACT

Immunohistochemical Evaluation of TLR-4, HSP-70, and Caspase-3 Expressions in Lesional Areas of Ecthyma Disease

Contagious ecthyma (Orf) is an economically significant disease caused by a parapoxvirus (ORFV) belonging to the *Poxviridae* family, affecting sheep, goats, and wild small ruminants. It is characterized by the presence of thick, crusted lesions around the mouth, lips, tongue, and nostrils. The infection predominantly affects animals under one year of age, with the highest incidence observed in those between 3 to 4 months old. In immunocompromised young animals, the disease can result in nearly 100% mortality. The virus is highly resilient, remaining viable in the environment for months or even years. Due to the painful oral lesions, affected animals are unable to feed properly, leading to malnutrition, increased mortality, and significant production losses. The virus exhibits a strong tropism for epithelial tissue and replicates in epidermal keratinocytes. Although keratinocytes play a protective role in host defense, ORFV can efficiently evade these mechanisms. Toll-like receptor 4 (TLR-4), heat shock protein 70 (HSP-70), and Caspase-3 are molecules known to play crucial roles in cellular stress responses, inflammation, and apoptosis, and are thought to be significant in the pathogenesis of infectious diseases. The aim of this study was to investigate the expression of TLR-4, HSP-70, and Caspase-3 in lesional tissues of animals affected by ecthyma. For this purpose, 37 ecthyma lesions were examined histopathologically and immunohistochemically. The expression levels of all three markers were found to be increased in both epithelial and inflammatory cells within the lesional areas. The findings suggest that TLR-4, HSP-70, and Caspase-3 play important roles in the pathogenesis of ecthyma and may potentially serve as diagnostic or therapeutic targets in the future. Further studies are warranted to elucidate their precise roles.

Keywords: Ecthyma, TLR-4, HSP-70, Caspase-3, IHC

1. GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

Bulaşıcı ektima (ORF), koyun, keçi ve yabani küçük ruminantlarda görülen Poxviridae ailesinden bir parapoxvirusun (ORFV) oluşturduğu ekonomik önemi büyük bir hastalıktır. Ağız çevresi, dil, dudak ve burun deliği çevresinde sert kabuklu yaralar ile karakterizedir. Persiste ektima enfeksiyonlarının immun yetmezlik sonucunda ortaya çıktığı düşünülmektedir. Özellikle 1 yaş altı gruptaki hayvanlar enfekte olmakta, ancak en sık doğum sonrası 3-4 aylık hayvanları etkilemektedir. İmmun yetmezliği olan yavru hayvanlarda mortalite %100'e yakın seyretmektedir. Etrafa saçılan virus aylarca hatta yıllarca canlılığını korumaktadır. Ağızda oluşan yaralar nedeniyle yavrular yeterince beslenemezler. Bu sebeple ektima ölümlere ve önemli verim kayıplarına neden olmaktadır. ORFV ile enfekte olmuş dokunun; sitokin analizlerinde, immun yanıtta baskın olarak epidermal hücreler, damar endotel hücreleri ve Tümör Nekroz Faktörü- α (TNF- α) üreten lenfosit morfolojisine sahip karakteristik olmayan hücreler tespit edilmiştir. Enfeksiyon durumunda hızlı yanıt veren bu hücreler, diğer moleküler sensörler ve Toll-like reseptör bölgelerinde yanıtlar oluşturmaktadırlar. Toll, patojenlere karşı bağışık yanıtta önemli rol oynayan bir gendir. Toll benzeri reseptörler (TLR) ve Pattern Tanıma Reseptörler (PRR), Patojenle-İlişkili Moleküler Patern modeller (PAMP) olarak bilinen mikrobiyal molekülleri spesifik olarak tanıma yeteneğine sahiptirler. TLR'lerin kanser, diyabet, ateroskleroz, renal hastalıklar, gastrointestinal hastalıklar, respiratuvar hastalıklar, santral sinir sistemi hastalıkları ve otoimmün hastalıklar gibi geniş bir hastalık gurubuyla bağlantılı olduğu tespit edilmiştir. TLR'ler konumlarına göre iki alt aile olarak sınıflandırılır. Hücre zarının içinde bulunan TLR1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6 ve TLR-11 mikroorganizmalarda bulunurken, hücre içinde yani endoplazmik retikulum, endozomlar ve lizozomlar gibi organellerde bulunan ve mikrobiyal veya viral nükleik asitlere bağlanan TLR-3, TLR-7, TLR-8 ve TLR-9'dur. TLR-2'nin lipoproteinleri/lipopeptitleri (LP), tanıyan reseptör olduğu kabul edilmektedir. TLR-2; peptidoglikan, lipoteikoik asit, gram pozitif lipopolisakkarit ve bir grup gram pozitif makromolekül ile bağlanarak yanıt verebilmektedir. TLR-4'ün bir LPS reseptörü olduğu ve bu reseptörün fonksiyonel olarak hücre dışı alanı aracılığıyla;

gliserofosfatidilinositol bağlantılı proteinin (CD14), MD-2 ve LPS bağlayıcı proteini içeren kompleks oluşturur. Doğal immun sistemde tehlike sinyalleri olarak görev yapan, hasarlanmış veya stres altında olup nekroza yönelen hücrelerden serbestleşen ısı şoku proteinleri (HSP-60 ve HSP-70) evrimsel olarak korunmuş moleküllerdir. HSP-60'ın TLR-4 yoluyla makrofajları aktive ettiği ve bir inflamasyon kaskadını indüklediği tespit edilmiştir. HSP-70 molekülünün de LPS kontaminasyonunda TLR-4'ü aktive etme yeteneği olduğu belirlenmiştir.

Apoptozisde rol oynayan Sistein Aspartat Spesifik Proteaz (Cystein Aspartat Spesifik Protease CASPASE) olarak adlandırılan kaspazlar, fazla ya da hasarlı olan hücrelerin apoptotik hücre ölümü esnasında ortadan kaldırılmasında önemli rol oynayan multigen ailesine bağlı proteazlardır ve intrasellüler proenzimler olarak sentezlenmektedirler. Kaspazlar mitokondride hücre zarının hasar görmesini ve bunların sonucunda zar değişimleri, hücre iskeletini ve çekirdek parçalanmasına neden olan hasarlar oluşturabilir. Kaspazlar, hasarlı veya fazla olan hücrelerin çevrelerine zarar vermeden kaldırılmasını sağlayan, apoptozis uyaran sistein proteazlar olarak görev yaparlar yani apoptik hücrelerde meydana gelen morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin gerçekleşmesinde anahtar rol oynayan enzimlerdir. Başlatıcı kaspazlara dahil olan kaspazlar 2, 8, 9 ve 10'dur. Bunlar efektör kaspazları aktive eden proteazlardır. Efektör kaspazlara 3, 6 ve 7 kaspazlar dahildir. İnflamatuvar kaspazlara diğer ismiyle sitokinleri aktive eden kaspazlara ise 1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14 kaspazlar dahildir. Sinyal iletiminde önemli role sahip olan sitokinlerin aktivasyonları için gerekli olan bu kaspazlar, lenfokin üretiminden de sorumludur. Ayrıca bu grup kaspazlar mikrobiyal patojenlere karşı immun yanıtta görevlidir. Tüm kaspazlar, hücrelerde katalitik olarak aktif olmayan zimojenler olarak üretilir ve apoptozis sırasında proteolitik işleme ve aktivasyona tabi tutulurlar. Kaspazlar programlanmış hücre ölümünün (apoptozis) önemli araçlarıdır. Bunların arasında kaspaz-3, birçok önemli hücre proteinin spesifik bölünmesini katalize eden, sıklıkla aktive olan bir ölüm proteazıdır. Mitokondriyal sitokrom c salınımına ve kaspaz-9 fonksiyonuna bağlı veya bağımsız olan kaspaz-3 aktivasyonuna giden yollar tanımlanmıştır. Kaspaz-3 normal beyin gelişimi için gereklidir ve diğer apoptotik senaryolarda doku, hücre tipi veya ölüm uyarısına özgü bir şekilde önemli veya gereklidir. Kaspaz-3 ayrıca apoptozun bazı

tipik özellikleri için de gereklidir ve incelenen tüm hücre tiplerinde apoptotik kromatin yoğunlaşması ve DNA parçalanması için vazgeçilmezdir. Bu nedenle kaspaz-3, hücrenin parçalanması ve apoptotik cisimciklerin oluşumu ile ilişkili belirli süreçler için gereklidir, ancak aynı zamanda hücre canlılığının kaybının taahhüt edildiği aşamada veya öncesinde de işlev görebilir. Bu çalışmanın amacı HSP-70, TLR-4 ve CAS-3'ün ektima olgularında immunohistokimyasal olarak ekspresyonlarının belirlenmesidir.

1.1.1. Ektima

Ektima; *Chitovirales* takımı, *Poxviridae* familyasında, *Chordopoxvirinae* alt familyasında bulunan *Parapoxvirus* cinsi altında Orf virus (ORFV) tarafından oluşturulan bir hastalıktır (ICTV, 2024). ORFV bulaşıcılığı yüksek ve zoonotik karakterde bir hastalık şekillendirir. Hastalığın morbiditesi %15 civarındadır ancak sekonder bakteriyel enfeksiyonlara bağlı olarak da mortalite %100'e ulaşabilmektedir. Hastalık koyun ve keçilerde; bulaşıcı pustular dermatitis, infeksiyöz pustular dermatitis, scabby mouth, contagious pustular stomatitis, contagious ecthyma ya da kısaca ektima olarak adlandırılabilir (Atlı, 2017; Bergqvist ve ark., 2017; Cargnelutti ve ark., 2011; Gülyaz ve ark., 2016; Karki ve ark., 2019; Nandi ve ark., 2011). Bulaşıcı ektima dünya çapında küçükbaş hayvanlar arasında yaygın olarak seyretmektedir. Hastalık yaz sonu, sonbahar ve kış aylarında daha fazla görülmektedir. Kuzu ve oğlaklar hastalığa yetişkin hayvanlara göre daha duyarlıdır. ORFV kurumaya dayanıklıdır ve uygun ortamlarda yıllarca stabilitesini korumaktadır. Virus, hayvanların uzayan yünü üzerinde de uzun süre canlı kalabilmektedir. ORFV hasar görmüş deri yoluyla vücuda girmekte ve epidermal hücrelerde çoğalmaktadır. Ayrıca klinik olarak sağlıklı görünüme sahip koyunlardan ilaç havuzlarına dalma veya daldırma işleminin uygulanması sonrasında duyarlı koyunlara hastalığın bulaştırılabildiği bildirilmiştir (Nandi ve ark., 2011; Onyango ve ark., 2014). Aşılama, ektima enfeksiyonlarında etkin kontrol için tek seçenektir. Her ne kadar ektimaya karşı çeşitli aşılar kullanılsa da canlı zayıflatılmış aşılardan her zaman diğerlerinden daha etkili olduğu ve hastalığın endemik olduğu ülkelerde kullanıldığı bilinmektedir. Gebelikte de aşılama mümkündür (Nandi ve ark., 2011; Onyango ve ark., 2014).

1.1.2.Etiyoloji

Orf virionları uzun ekseninde 260 nm ve kısa ekseninde 160 nm uzunluğunda belirgin bir oval yapıya sahip, linear çift sarmallı DNA (dsDNA) içerir (Cargnelutti ve ark., 2011). Virus replikasyonu konakçı hücrenin sitoplazmasında gerçekleşir (Bergqvist ve ark., 2017; Karki ve ark., 2019). Çoğu gen (yaklaşık %80) genomun merkez bölgesinde konumlanmıştır. Bu genler diğer Poxviruslarla homologdur (Cargnelutti ve ark., 2011). Genomun terminal bölgeleri hücre kültürlerindeki viral replikasyon için vazgeçilebilir gen içerir, ancak virusun *in vivo* şartlarda hayatta kalması için gereklidir. Virulens genleri olarak bilinen bu genler ve ürünleri virusun çoğalması için yardımcı faktörlerdir. Belirli konakçılarda immun sistemde hayatta kalmaktadır. Bu genlerden bazıları Parapoxvirus'una (PPV) özgüdür. Virulens, patogeneze, konakçı spektrumunu belirlemekten sorumludurlar. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) geni Parapoxviruslara özgüdür ve *Parapoxviridae* ailesinin diğer üyelerinde bulunmamaktadır. Özet olarak ORFV'nin çoğu genini konakçının homolog genlerinden elde ettiğini göstermektedir. Virulens genlerinin bazıları varyasyonlara sahiptir, virusun affinite gösterdiği hücreleri yani keratinositleri başarıyla enfekte etmeye yardımcı olmakta ve inflamasyonda sinyal görevi görmektedirler. Bu virulens genlerinin -kombine olarak- enfeksiyonda inflamatuvar immun sistemi etkisiz hale getirdiği bilinmektedir (Karki ve ark., 2019).

ORFV çevre şartlarına (sıcak-soğuk) dayanıklıdır. ORFV, kuru çevre şartlarında aylarca hatta yıllarca hayatta kalabilmektedir. Virus, lezyonlardan kaynaklanan kabuklarda 15 yıla kadar canlı kalabilmektedir (El-Tholoth ve ark., 2015; Esmali ve ark., 2021). ORFV bir dizi virulens faktörünün gelişimiyle immun sistemden kaçma stratejileri geliştirmiştir. Tamamen inaktive edilmiş ORFV'ü immunomodülatör olarak da kullanılmaktadır (Bergqvist ve ark., 2017; Karki ve ark., 2019).

1.1.3. Epizootiyoloji

Ektima, genellikle koyun ve keçilerde yaygın olarak, yabani ruminantlarda da görülen viral bir enfeksiyondur. ORFV'nin konakçı spektrumunda koyun ve keçiler dışında; develer, ceylanlar, ren geyikleri, misk öküzleri ve Japon keçi-antilopları yer

almaktadır. ORFV'nin ana konakçıları koyun ve keçilerdir. Virus'un deve, alpaka (lama), sincap, deniz aslanları ve foklarda da enfeksiyon oluşturabildiği rapor edilmiştir. Ayrıca; katır geyiği, akkuyruklu geyik, çatalboynuzlu geyik, wapiti buzağısı gibi yabani hayvan türlerinde doğal ve deneysel olarak hastalık oluşturabilmektedir (Karki ve ark., 2019).

Hastalık genellikle önemli bir mortaliteye sahiptir. ORFV genç yaştaki hayvanları daha çok etkilemektedir. Özellikle 1 yaş altı gruptaki hayvanlar enfekte olmakta, özellikle 3-4 aylık hayvanları etkilemektedir. Ölüm oranları sekonder bakteriyel enfeksiyon ve süt emme durumuna göre kuzu ve oğlaklarda %10-90 arası değişmesine rağmen bu oran yetişkinlerde daha düşüktür (Atlı, 2017; Karki ve ark., 2019). İmmün yetmezliği olan yavru hayvanlarda mortalite %100'e yakın seyretmektedir. Morbidite sekonder bakteriyel ya da paraziter enfeksiyona bağlı olarak artmaktadır (Cargnelutti ve ark., 2011). Ektima genç hayvanların dışında ergin koyun ve keçilerde çeşitli lezyonlarla karakterize enfeksiyonlar şeklinde görülmektedir (Atlı, 2017).

Kabukların dökülmesi ile etrafa saçılan virus aylarca hatta yıllarca canlılığını korumaktadır. Kabukla kontamine çimler ve malzemeler yoluyla indirekt olarak veya direkt olarak bulaşma gerçekleşebilmektedir (Cargnelutti ve ark., 2011). İlkbahar sezonunun sonuna doğru hastalık yoğunlaşmaktadır. Kurak mevsimlerde kuru otlarla beslenmeye bağlı olarak hastalık oranlarında artışlar görülebilmektedir (Maganga ve ark., 2016). Persiste enfekte hayvanların koyun sürülerine alınması sonrası reenfeksiyonlar gelişebilmektedir (Karki ve ark., 2019). Ayrıca, ev sineğinin (*Musca domestica*) lezyonlara teması sonrası kanat ve bacaklarında ORFV'yi taşıdığı ve sağlıklı hayvanlara temas yoluyla bulaştırabildiği de bildirilmiştir (Raele ve ark., 2021).

Persiste ektima enfeksiyonlarının immün yetmezlik sonucunda ortaya çıktığı düşünülmektedir. İmmün sistemi olumsuz etkileyen nedenler arasında; hayvanların nakli, mineral vitamin eksikliği, kuru ve sert otlaklarda otlatmak, rasyondaki bakır ve demir eksikliği sayılmaktadır (Gülyaz ve ark., 2016).

Hastalık, mesleki zoonoz hastalık olarak kabul edilir. Veteriner hekimler, çobanlar, kasaplar, çiftçiler, yün kırkıcılar ve mezbaha işçileri riskli meslek gruplarını oluşturmaktadırlar. Ektima genellikle ilkbahar ve yaz aylarında görülmektedir. Fakat yılın her döneminde hastalığın görülme olasılığı bulunmaktadır. Etken direkt ve indirekt temas yoluyla bulaşmaktadır. Hayvanlar, gıdalar ve karkaslardaki etkenlerin derideki yara ve sıyrıklardan direkt konakçıya girebildiği bildirilmiştir (Cargnelutti ve ark., 2011; Atlı, 2017; Bergqvist ve ark., 2017). İnsanlarda ORFV enfeksiyonu, enfekte koyun, keçiler ya da virusla bulaşık malzemeler ile direkt temas yoluyla bulaşmaktadır (Karki ve ark., 2019).

1.1.4. Hastalığın Zoonotik Karakterizasyonu

ORFV 1787 yılında tespit edilmiştir. Ancak daha önceleri hayvan bakıcıları ile diğer insanların hayvanların derisinde oluşan kabuklanmadan dolayı hastalığı bildiği düşünülmektedir (Ülgenalp ve ark., 2018). Ektima, viral zoonotik hastalıklar arasında yer almaktadır. Dünya çapında gün geçtikçe artan salgınlar olduğu bildirilmiştir (Lawan ve ark., 2021). Çiftlik hayvanları ve hayvan bakıcıları tarafından çok hızlı bir şekilde virus yayılarak hastalık oluşmaktadır. 2020 yılında develerden insana ORFV bulaştığı rapor edilmiştir (Alajlan ve Alsubeeh, 2020). Bir meslek hastalığı olarak çok sayıda vaka bildirilmiştir. Lezyonlar genellikle eller ve parmak aralarında görülmektedir. Enfeksiyon genellikle multiform eritemler gibi sistemik formda görülmektedir. Nadiren generalize lenfadenopatiler de görülebilmektedir. Az da olsa insandan insana bulaşma vakaları da rapor edilmiştir (Karki ve ark., 2019).

1.1.5. İmmun Sistem İlişkisi

Ektima genellikle çift tırnaklılarda akut seyirli olarak görülse de kronik seyir de gösterebilir. Etken genellikle deri ve oral bölgeye yerleşmektedir. Virus bakımından zengin kabukların dökülmesiyle çevrede yayılım göstermektedir. Konakçı bağışıklığı hastalığın şiddetini sınırlayan ana faktördür. Belirli düzeydeki immün yanıtı rağmen konakçı tekrar tekrar enfekte olabilmektedir (Bergqvist ve ark., 2017).

Deri; memelilerin en büyük organıdır ve canlıyı yaralanma ve enfeksiyonlardan korur. Derinin hücresel immun sistemi ve lenfatik organ sistemi, mikrobiyal patojenlere devamlı maruz kaldığından, bu tür mikroorganizmalara karşı etkili ve hızlı yanıt oluşturma açısından gelişmiştir. Keratinositler epidermis hücrelerinin yaklaşık %90'ını oluşturur ve derinin immun sistem koruyucuları olarak evrimleşmişlerdir. Kritik durumlarda erken immun sistem yanıtını başlatmada interferon (IFN)'lar ve proinflamatuvar sitokin ürünleri hayati öneme sahiptirler. Enfeksiyon durumunda hızlı yanıt veren bu hücreler, diğer moleküler sensörler ve Toll-like reseptör bölgelerinde yanıtlar oluşturmaktadırlar (Fleming ve ark., 2015).

Parapoxvirus'un evrimleşmesi sonucunda viral interlökin-10 (IL-10) ve VEGF ile birlikte konakçıdan kaçabildiği tespit edilmiştir. Virus'a karşı immun cevap; CD4+T hücreleri, CD8+T hücreleri, sitokin, IFN ve antikorları içermektedir (Nandi ve ark., 2011; Onyango ve ark., 2014). Ektima enfeksiyonunda konakçı tepkisinde öncelikle bölgeye nötrofillerin infiltrasyonu gerçekleşmektedir. Ardından virus ile enfekte epidermal hücrelerin etrafındaki dendritik hücrelerin (DC), CD4+T hücrelerinin, CD8+T hücrelerinin ve B hücrelerinin birikmesi ile karakterize bir yanıt oluşmaktadır. ORFV enfeksiyonlarında enfekte olmuş hücrelerin yakınındaki hücrelerde majör histokompatibilite kompleksi-2 (MHC-II) dendritik hücrelerin yoğun ağ oluşturmaları, orf lezyonunun kendine özgü bir özelliğidir. Bunun dışında CD8+T hücreleri, virus ile enfekte hücreleri MHC-II yolu ile öldürmek için konakçı antiviral bağışıklığında önemlidir. Bu nedenle ORFV enfekte olmuş konakçıda; CD4+ hücreleri, CD8+ hücreleri, IFN ve antikor içeren hızlı bir humoral ve hücresel immun yanıt oluşmaktadır. ORFV, IL-10, konakçının bir başka viral gen homologudur, antijen sunan hücrelerin apoptozunu arttırarak, T hücre aracılı immun yanıtın azalmasına sebep olarak viral immun yanıtı kaçışta rol oynayan önemli bir virulens geni olarak işlev görmektedir (Shkhaidem, 2016). ORFV ile enfekte olmuş dokunun; sitokin analizlerinde, immun yanıtta baskın olarak epidermal hücreler, damar endotel hücreleri ve Tümör Nekroz Faktörü- α (TNF- α) üreten lenfosit morfolojisine sahip karakteristik olmayan hücreler tespit edilmektedir. Bu hücreler enfeksiyon sırasında deride hızla artış göstermektedir. CD4+T hücrelerinin virusun temizlenmesinde kritik bir rolü olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle CD4+T hücrelerinde oluşan bir azalmanın, lezyon

büyükliğünde artışına neden olduğu belirtilmiştir. CD8+T hücrelerinde azalmanın ise benzer fakat daha küçük etkili olduğu gözlenmiştir. Şiddetli ORFV lezyonlarında deride IL-2 ve IFN- γ inhibisyonu ile ilişkili tablo gözlenmiştir (Fleming ve ark., 2015).

Yeniden enfekte olan hayvanlarda ektima enfeksiyonuna lokal immun sistem cevabı olarak; CD4+T hücreleri, CD8+T hücreleri, B hücreleri ve DC'nin tespit edildiği bifazik bir lenföhücre sel yanıt oluştuğu bilinmektedir. CD4+T hücrelerinin afferent lenfte en çok lenfosit sayısına sahip alt kümesi olduğu ve yeniden enfekte olmuş koyunlarda enfeksiyon sonrası 4. ve 12. günlerde sayılarının zirveye ulaştığı bildirilmiştir. Ayrıca kümeleşmiş lenf hücrelerinde afferent lenften Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör (GM-CSF), IL-1, IL-8, IL-2 ve IFN- γ üretiminde de benzer oluşumlar gözlenmiştir. Yeniden enfekte olmuş hayvanlara inaktive edilmiş ORFV verildiğinde, bir bellek tepkisini gösteren güçlü bir gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu oluşturmaktadır (Fleming ve ark., 2015).

Virus, epitelyotropiktir ve epidermal keratinositlerde çoğalmaktadır. Keratinositler organizmayı korumakla görevli olmasına rağmen ORFV bu savunmadan rahatlıkla kaçınabilmektedir. Stratum bazaledeki keratinositlerde şişkinleşme ve vakuolizasyon ile karakterize enfeksiyon oluşmaktadır. Enfeksiyöz virionlar enfeksiyondan 12 saat sonra tespit edilebilmektedir ve enfeksiyon sonrası 24-72 saat arasında maksimum titreye ulaşmaktadır. Lezyonlar kabuklaşıp dökülerek çevreyi kirletmekte ve virus doğada lokalize olarak kalmaktadır. Bu durum ise temasla diğer hayvanlara bulaşma olasılığını artırmaktadır. Enfeksiyonların olduğu yerdeki dendritik hücrelerin lenf düğümlerindeki T hücrelerine erişimi olmadığı için enfeksiyon kısıtlanmış ve lokalizedir. İmmun sistemin baskılanması, primer enfeksiyonlar, transport, stres faktörleri ve yaralanmalarla epitel bütünlüğün bozulması, hastalığın başlamasında ana kaynak olmaktadır (Karki ve ark., 2019).

Moleküler genetik araştırmalar virusun, immun sisteme yüksek uyum sağlayarak çoğaldığını ve hücreleri başarılı bir şekilde enfekte edecek durumda gen evrimleşmesine olanak sağladığını göstermiştir (Fleming ve ark., 2015).

1.1.6. Patogenez

Ektima koyun ve keçilerde makulopapüler, vesiküler, püstüler ve proliferatif lezyonlar oluşturarak dudakları ve dudak-burun arasındaki muko-kutanöz bölgeleri etkilemektedir. Virus epitel ve oral mukoza ile sınırlı kalmaktadır (Cargnelutti ve ark., 2011; Atlı, 2017). Virus mukozal membran, deri ve mezenşimal orijinli dokuları, ağız mukozasındaki keratinositleri ve epitelyal hücreleri de etkilemektedir (Fleming ve ark., 2015). Enfeksiyon ya subklinik ya da proliferatif lezyonlar şeklinde görülmektedir (Agius ve ark., 2019).

Hastalık insanlarda özellikle eller ve parmaklarda, nadir olarak yüz bölgesinde sınırları belirgin ağırlı lokalize püstüler lezyonlara neden olabilmektedir (Cargnelutti ve ark., 2011; Atlı, 2017; Karki ve ark., 2019).

Enfeksiyon oral mukoza, burun ve dudak arası muko-kutanöz bölgede oluşan lezyonlar ya da sıyrıklar yoluyla vücuda giriş yapmaktadır. Enfeksiyona bağlı deride multifokal eritem, papül, vezikül, püstül ve kabuk aşamaları gelişmektedir. Proliferatif ve krustöz lezyonlar genellikle kanayarak kurumaktadır. Ancak miyazis ve sekonder enfeksiyonlar da şekillenebilmektedir (Cargnelutti ve ark., 2011).

Evcil ve yabani koyun ve keçilerde ektima vakalarında ağız lezyonlarına bağlı ağrıdan kaynaklanan açlığa bağlı olarak hastalık şiddetinin artabileceği ve bu durumun lenf nodüllerinde şişme, artrit ve pnömoni gibi şiddetli ve orta şiddette lezyonlar ile diğer lezyonların gelişmesine predispozisyon oluşturabileceği bildirilmiştir (Özmen ve Dolu, 2018).

Ektima enfeksiyonlarında keçilerde kronik pnömoni, artrit, orta-şiddette lenfadenopati ve multifokal proliferatif dermatitis şekillenebilmektedir. Sistemik enfeksiyonlarda; gastroenteritis, bronkopnömoni ve sindirim sistemi bozuklukları gelişebilmekte ve trakea da etkilenebilmektedir. Bazı durumlarda, dilde nekrotik odaklar ve ülserler oluşabilmektedir. Enfeksiyon ağırlaştıkça sekonder enfeksiyon ile birlikte diş eti, farinks, rumen ve abomasumda da lezyonlar gelişebilmekte ve karaciğer

apseleri de görülebilmektedir. Hastalığın ileri evresinde, hayvanlarda pnömoniye bağlı olarak ölümler de bildirilmiştir (Nandi ve ark., 2011).

1.1.7. Klinik Bulgular

Lezyonlar genç hayvanlarda burun delikleri ile dudak arasındaki deri ve oral mukoza epiteli, ağız çevresi, dudak ve diş etlerinde görülmektedir. Ağız bölgesinde lezyonları olan kuzu ve oğlaklar emme sırasında annelerine enfeksiyonu bulaştırmaktadır. Bunun sonucunda emziren ergin koyun ve keçilerin memelerinde lezyonlar gelişmekte ve buna bağlı olarak mastitise yol açabilmektedir. Hastalıktan etkilenen hayvanların dillerinde de lezyonlar görülebilmektedir. Ayaklarda oluşan lezyonlar, tırnak üstünde ve tırnak arasında şekillenebilmektedir. Genital formda ise meme loblarında, bacağın iç kısımlarında, vulvada ve prepisyumda lezyonlar görülmektedir. Klinik olarak hastalık proliferatif seyirlidir. Diğer Poxviruslarda görüldüğü gibi; eritem, papül, vezikül, püstül, kabuk aşamalarıyla gelişen genellikle kendini sınırlayan lezyonlar oluşturmaktadır. Hastalık genellikle 3-4 hafta sürer ve 1-2 ayda skar dokusu oluşmadan iyileşme görülmektedir (Atlı, 2017; Gülyaz ve ark., 2016; Karki ve ark., 2019).

Enfeksiyon çoğunlukla süt emen kuzu ve oğlakları etkilemektedir. Hasta hayvanlarda; özellikle gençlerde gıda alımını önemli ölçüde azaltmaktadır. Buna bağlı olarak gençlerde büyüme bozukluğu, kuzu ve oğlaklarda ölümler görülmektedir. Bu durum ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Cargnelutti ve ark., 2011). Birçok türde reenfeksiyon oluşur ve hızlı yayılım gösterir. Sekonder enfeksiyon olarak bakteriyel ve paraziter enfeksiyonlar gelişebilmekte ve enfeksiyon süresi uzamaktadır (Atlı, 2017; Bergqvist ve ark., 2017).

İnsandan insana bulaşma konusunda detaylı bir araştırma bulunmamaktadır. İnsanlarda görülen enfeksiyonlarda genellikle 3-6 hafta arasında kendiliğinden iyileşme görülmektedir. Spesifik tedavisi yoktur. Kriyoterapi, transeksizyon, elektrokoter kullanımı gibi yaklaşımların tedavide başarıyı artıran uygulamalar olduğu ifade edilmiştir (Bergqvist ve ark., 2017).

1.1.8. Teşhis

Ektimanın teşhisi için lezyonların makroskopik görünümü önemlidir. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunofloresan (IF), Agar gel immunodiffüzyon (AGID) ve Serum nötralizasyon (SN) testleri etkenin serolojik teşhisi için kullanılmaktadır (Adedeji ve ark., 2017; Atlı, 2017; Nandi ve ark., 2011; Oliveira ve ark., 2012; Pal, 2018). ORFV enfeksiyonlarında moleküler teşhis yöntemleri ağırlıklı olarak kullanılmaktadır (Karki ve ark., 2019).

1.1.9. Nekropsi ve Histopatoloji

Ektimada nekropsi bulguları arasında dudakların kommisuralarından başlayan ve dudak kenarları ile burun ucuna kadar uzanan kabuklu lezyonlar sayılabilir. Ayrıca primer lezyonlara gözlerde, şiddetli olgularda ise gingiva damak ve dilde rastlanır. Bu lezyonlarda daha az olarak meme başı ve çevresinde de gözlenebilir. Lezyonlar çiçek lezyonlarına benzer şekilde gelişir. Veziküler devre geçicidir ve küçük, düzgün ve göbekli olmayan papüler lezyonlar kısa sürede şekillenir. Bu lezyonlar genellikle 2-4 mm kalınlığında olup gri-esmer renkli ve kalın bir kabuk tabakasıyla kaplıdır (Özmen ve Dolu, 2018).

Mikroskopik olarak epidermiste orto ve parakeratotik hiperkeratozis belirgindir. Stratum spinosum ve granülozum tabakalarındaki epitel hücrelerinde vakuoller ve balonumsu dejenerasyonlar saptanır. İntrasitoplazmik inklüzyon cisimcikleri hastalık için karakteristiktir. Stratum germinativumdaki epitel hücrelerinin dermise doğru hücre proliferasyonları gönderdiği gözlenir. Lezyonlarda proteinli bir ödem sıvısı, dejenere nötrofil lökositler, dökülmüş hücre artıkları ve sıklıkla sekonder bakterilerin oluşturduğu kolonizasyonlardan oluşan bir kabuk görülür. Dermiste damarlaşmada artış ve damarlarda hiperemi sıklıkla gözlenir. Kapillar hiperemi ve hücrel infiltrasyonlar belirgindir (Özmen ve Dolu, 2018). Genellikle lezyonlar 4 hafta içinde iyileşir. Yem ve su alamayan hayvanlarda lezyonlar daha şiddetlidir. Ayaklardaki lezyonlar sıklıkla

enfekte olur ve bakteriyel dermatitis ile selülitis gelişir. Meme derisindeki lezyonlar mastitise predispozisyon yaratır (Cargnelutti ve ark., 2011).

1.1.10. Ayırıcı Tanı

Akut ve proliferatif püstüler kutanöz lezyonlar; dudak derisi, ağız kommisuraları, oral mukoza ve burun delikleri kısmında görülen tipik bulgulardır. Histopatolojik olarak keratinositlerde şişme ve vasküler dejenerasyon gibi tipik bulgular görülmektedir. Ektimanın ayırıcı tanısında; koyun çiçeği, keçi çiçeği, şap, mavidil ve koyun keçi vebası göz önünde bulundurulmalıdır (Pal, 2018).

Ektimada mikroskopik olarak oluşan lezyonların, belirgin epidermal hiperplazi, balonumsu dejenerasyonu ve veziküler aşamada görülebilen keratinositler içindeki eozinofilik intrasitoplazmik inklüzyon cisimleri ile karakterize olduğu bildirilmiştir. Keratinositlerde tipik ve karakteristik intrasitoplazmik inklüzyon cisimleri, ektimayı histopatolojik anlamda diğer hastalıklardan ayırmak için önemlidir (Özmen ve Dolu, 2018).

Capripoxvirus (CaPV), Şap (Food and Mouth disease-FMD), Sığır herpesvirus tip-2 ve Mavidil (Bluetongue virus-BTV) gibi benzer lezyonlarla seyreden hastalıkların, ektimadan moleküler düzeyde ayırıcı tanısının yapılması gerekmektedir (Gallina ve ark., 2006; Karki ve ark., 2019).

Şap hastalığında oral lezyonların koyunların üst ve alt diş etleri ve dil gibi travmaya karşı savunmasız bölgelerde gelişme olasılığı daha yüksektir. Fakat ektima ve şap arasında ayırıcı tanıya izin veren ana klinik özellik, ektimanın proliferatif lezyonları indüklemesidir. Ancak Aphthovirus proliferatif lezyonları indüklememektedir. Koyun ve keçi çiçeği, tüm vücut üzerinde yaygın papüller ile karakterizedir (Nandi ve ark., 2011).

Mavidil hastalığında enfekte hayvanların ağız lezyonları ve bu bölge mukozalarının koyu mavi siyanotik görünümde olması karakteristik tabloyu oluşturmaktadır. BTV'nin damar endotel hücrelerinde oluşturduğu hasara bağlı olarak mukozal ödem, hemokonsantrasyon, pulmoner ödem, hidrotoraks, hidrokardiyum,

serozal hemoraji, tromboz, düşük tansiyon ve şok gibi klinik belirtiler gözlenmektedir. Dudaklarda oluşan şişlik ve siyanotik görünümdeki dilin ağızdan dışarı sarkması hastalık için karakteristik görünümüdür. Mavidil hastalığında keçilerde süt veriminin ani kaybı ve 42°C'ye varan yüksek ateş gibi klinik semptomlar görülmektedir. Ağız boşluğunda görülen lezyonlar genellikle peteşiyel kanamalar, ülserler ve erozyonlardan oluşmaktadır. Ağız mukozasında, dilin bazı bölgelerinde ve diş etinde nekrotik ve siyanotik alanlar gözlenmektedir. Etkilenen hayvanların ayak koroner bölgesi hiperemiktir ve bu bölgelerde peteşiyel veya ekimotik hemorajiler oluşmaktadır. Mavidil hastalığı için pulmoner arterde yer alan peteşiyel kanamaların patognomik olduğu belirtilmektedir (Saltık ve Kale, 2017).

1.1.11. Coğrafi Dağılım ve Ekonomik Etki

Ektima dünya çapında yaygın olarak görülen bir enfeksiyondur. Koyun ve keçi yetiştirilen ülkelerde endemik seyir göstermektedir (Cargnelutti ve ark., 2011). Müslüman ülkelerde KurbanBayramında kesilen hayvan sayısı arttığı için her yıl bir salgın meydana gelmektedir. Türkiye, Ürdün, İran ve Suudi Arabistan gibi ülkeler bu salgının olduğu ülkeler arasındadır (Bergqvist ve ark., 2017).

Hem koyun hem de keçilerde dünya çapında birçok Ektima vakası rapor edilmiştir. Ektima çeşitli ülkelerde endemik olmasına rağmen; Office International des Epizooties (OIE) tarafından ihbari zorunlu hastalık listesinde yer almamaktadır. Birçok ülkede ekonomiyi etkileyen yüksek bulaşma özelliği sebebiyle hayvanlarda verim kabına yol açtığı bilinmektedir (Karki ve ark., 2019).

Yunanistan (2003-2004), Kore (2009), Brezilya (2005, 2009), Hindistan (2006, 2009, 2010), Tayvan (2007) ve Japonya dahil olmak üzere birçok ülkede ektima salgınları meydana gelmiştir (Chi ve ark., 2013).

2013'te Arjantin'in Rio Negro eyaletinin Pilcaniyeu kasabasından gelen koyun sürülerinde ektima salgını meydana geldiği bildirilmiştir (Peralta ve ark., 2015). İngiltere'de, 2011-2012 yılları arasında incelenen 3000 çiftlikteki hayvanlarda ektima enfeksiyon varlığı koyunlar için %1,88, kuzular için %19,53 olarak bildirilmiştir

(Onyango ve ark., 2014). Türkiye'nin Kars bölgesinde ektima seroprevalansı kuzularda %52,81, ölüm oranı %2,81 olarak bildirilmiştir (Gökce ve ark., 2005). Tayvan'ın merkezinde çok sayıda ektima salgını vakasının kaydedildiği bildirilmiştir (Chan ve ark., 2007). Bildirilen vakaların morbiditesi %2-6 arasında, kuzularda mortalite oranı ise %0,8'den az olduğu tespit edilmiştir. Çin'de 655 keçinin bulunduğu sürülerde %60 morbidite ve %24,7 mortalite tespit edildiği rapor edilmiştir (Zhang ve ark., 2010). Bangladeş'te, PCR sonuçlarına göre morbidite %23,89 ve mortalite %1,02 olarak belirlenmiştir (Azad ve ark., 2016). Çin'in güneyindeki Fujian Eyaletinde, 2011-2012 yılları arasında sağlıklı sürülerden 106 keçi serumunun %16'sı ve iyileşen sürülerden 182 keçi serumunun %83'ü ektima yönünden seropozitif bulunmuştur (Chi ve ark., 2013). Tüm bu raporlar, ektimanın koyun, keçi, diğer çiftlik ve yabani hayvanlar arasında endemik olduğunu ve bu durumun özellikle oğlak ve kuzular arasında yüksek ölüm oranı nedeniyle dünya çapındaki çiftçilerin ekonomisinde gerilemelere yol açabileceği vurgulanmıştır (Lawan ve ark., 2021).

İngiltere'de ektimadan etkilenen 2.167 milyon koyuna dayalı olarak üretim kayıplarının ve maliyetlerinin 10 milyon dolar ve kişi başına 4,62 dolar olacağını öngörerek ekonomiye yönelik önemli sıkıntılara işaret edilmiştir (Onyango ve ark., 2014).

Türkiye'de TÜİK verilerine göre 2022 yılında yaklaşık 58 milyon küçükbaş hayvan varlığı bulunmaktadır. Türkiye'de ektima mortalite oranının yaklaşık olarak %50, mortalitesinin yaklaşık %2,5 olduğu bildirilmiştir. TİGEM ortalama damızlık toklu hayvan fiyatlarının 2022 yılında yaklaşık 3000TL olduğunu bildirmiştir. Bunun sonuca dayanarak 2,2 Milyon TL maddi kayıp olabileceği ön görülmektedir (TAGEM, 2022; TÜİK, 2022).

1.1.12. Koruma ve Kontrol

Lezyon görülen hayvanların sağlıklı, aşısız hayvanlardan karantina yoluyla ayrılması gerekmektedir. Sürülerde yün, kıl kırkma işlemlerinde oluşan yaralanmalarda antiseptik kullanılmalıdır. Sürülerin otlatıldığı meralardaki dikenli otların yok edilmesi

veya otlatmada tercih edilmemesi ağız bölgesinde oluşabilecek yaraları önlemek açısından önemlidir (Kale ve Atlı, 2017).

Ektima tedavisinde, oluşabilecek ya da oluşmuş sekonder bakteriyel enfeksiyonlar için antibiyotikler (penisilin türevleri) kullanılabilir. Ayrıca destekleyici sıvı sağaltım uygulamaları yapılabilir. Lezyonlu bölgede oluşabilecek insektlere karşı sinek kovucu ve larvisid ilaçlar kullanılmalıdır (Kale ve Atlı, 2017).

Türkiye’de ticari olarak Dollvet firmasının canlı ektima aşısı Orfdoll®, koyun, kuzu, keçi ve oğlaklarda kullanılmaktadır. Orfdoll, 1 haftalıktan itibaren her yaştaki hayvana uygulanabilmektedir. Aşının bağışıklık süresinin maksimum 12 ay olması nedeniyle, her yıl aynı dozda tekrarlanması önerilmektedir. Enfekte olmuş sürülerde doğumdan hemen sonra, koruyucu amaçla ise doğumların tamamlanmasının ardından her yaştaki kuzu ve oğlaklara toplu olarak uygulanabilmektedir. Lezyon görülen hayvanlar sürüden ayrılmalı, geri kalan hayvanlara aşı uygulanmalıdır (Anonim, 2024a).

Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü tarafından üretilen PENORF®, kuzu ve oğlakları ektima hastalığına karşı korunması amacıyla hazırlanan liyofilize, canlı attenüe bir aşıdır. Aşı hastalığın görüldüğü sürülerde 3-8 haftalık yaştaki kuzu ve oğlaklara yapılır. Koruyucu amaçla doğumların tamamlanmasından sonra, hastalık çıkan yerlerde ise doğumdan hemen sonra, her yaştaki kuzu ve oğlaklara toplu olarak aşı uygulanabilmektedir. Aşı uygulamasında Regio inguinaleye (arka bacağın iç kısmı) 0.5-1 cm. uzunluğunda 3-4 çizgi halinde çaprazlama olarak iğne ile derinin ilk tabakasını geçecek kadar derin, fakat kanama yapmayacak şekilde skarifikasyon şekillendirilir. Skarifikasyon oluşturulan bölgeye aşı damlalığından 2-3 damla damlatılıp birkaç saniye bekletilerek aşı uygulanmış olmaktadır (Anonim, 2024b).

Vetal firmasının üretmiş olduğu Dermavac® Ektima Aşısı; kuzu ve oğlakları ektima hastalığına karşı korumak amacı ile uygulanmaktadır. Aşı uygulaması arka bacağın iç kısmına 0,5-1 cm uzunluğunda 3-4 çizgi halinde çaprazlama skarifikasyon şekillendirilir. Skarifikasyon oluşturulan bölgeye aşı damlalığından 2-3 damla damlatılıp birkaç saniye bekletilerek uygulanmaktadır (Anonim, 2024c).

Aşı uygulamalarında skarifikasyon oluşturulduğu için bölgedeki asepsi ve antisepsi kurallarına kesinlikle uyulmalı, kullanılan iğne ve enjektörler kimyasal maddelerle dezenfekte edilmelidir. Lezyon görülmemiş sürülerde aşının uygulanmasına ihtiyaç duyulmamaktadır. Türkiye’de bulunan aşilar canlı aşı olduğundan gebelere kullanımı önerilmemektedir ve hayvanların uygulama bölgesinde bir hafta içinde lokal reaksiyon görülebildiği bildirilmiştir (Altuğ ve ark., 2013).

Aşılar da kullanılan ORFV suşlarının veya izolatlarının, sahada lezyona neden olan suşlar arasındaki filogenetik ilişki ve genetik varyasyonları, aşiların etkinliğini belirlemektedir. Ayrıca, duyarlı konakçılarda enfeksiyonun yayılmasını önleyici ve enfeksiyonu kontrol altına alma yöntemleri başlatmak için yeterli bilgiyi sağlayacaktır. Sürülerde görülen enfeksiyonların moleküler olarak teşhis edilmesi, alt birim aşiları oluşturmak ve etkinliğini geliştirmek için önemli faktörlerden biridir. Görülen enfeksiyonlar antiviral terapötik ajanların geliştirilmesi için stratejiler sağlayabilmektedir. Sürülere ya da bölgeye özgü oluşturulan aşilar ve antiviral ajanlar hastalığı önleme ve kontrol altına alma bakımından daha etkin olacağı düşünülmektedir (Ülgenalp ve ark., 2018; Karki ve ark., 2019). Ektimanın gelişim sürecinde konakçı ile birlikte evrimsel süreci oluşturabileceği ve re-enfekte konakçılarda bağışıklığın ve immun bellekteki kalıcı direncinin arttırılabileceği düşünülmektedir (Karki ve ark., 2019).

Ülkemizde ektima, koyun ve keçilerde yaygın olarak her mevsimde görülebilen bir hastalıktır. Birçok ülkede de küçükbaş hayvanlarda orta ve şiddetli prevalans seviyelerinde tespit edilmiştir. Günümüzde hastalıkla ilgili olarak moleküler düzeyde yeni primerler kullanımına dayalı ve tedaviye yönelik farklı tabanlı hazırlanmış aşı geliştirme çalışmaları yoğun olarak devam etmektedir.

1.2.1. Toll-benzeri Reseptör 4 (TLR-4)

Toll benzeri reseptörler (TLR'ler) uzun zamandır mikrobiyal hareket ve deri hasarına yanıtta rolleri açısından incelenmiştir. TLR'ler, mikrobiyal kaynaklardan (patojen ilişkili moleküler desenler [PAMP'ler]) veya kendiliğinden türetilen stres sinyallerinden (hasar ilişkili moleküler desenler [DAMP'ler]) türetilen ligandlara

bağlanmanın bir sonucu olarak akut bir inflamatuvar yanıtı uyarmak için homo- veya heterodimerler oluşturan transmembran reseptörlerdir. TLR'ler, mikrobiyal veya stres sinyallerini algılamaya uygun olan hücre dışı zarda veya endosomal zarlarda bulunur. TLR uyarımı, sitokinlerin, interlökinlerin ve doğuştan gelen bağışıklık yanıtının diğer medyatörlerinin aktivasyonu ile bağlantılıdır (Beutler, 2000a; Beutler, 2000b; Erridge, 2010).

TLR'ler hakkındaki literatürün çoğunluğu makrofajlardaki aktivitelerine odaklanmıştır, ancak epitel hücreleri de dahil olmak üzere vücuttaki hücreler bu reseptörleri ifade eder (Kawai ve Akira, 2010). Deride keratinositler genellikle mikrobiyal saldırılara veya yaralanmadan kaynaklanan strese karşı ilk savunma hattıdır ve bu nedenle bağışıklık tepkisini ortaya çıkarmak için makrofajlarla koordine olurlar. Son çalışmalar TLR'leri sağlıklı derideki ve kronik veya hiperaktif inflamasyonla bağlantılı birçok epitel durumda inflamatuvar yanıtların başlatılması ve koordinasyonunda kilit oyuncular olarak göstermiştir. TLR-4'ün hem deri iltihabında hem de kanserde spesifik bir rol oynadığı gösterilmiştir. TLR-4 aktivitesi, bakteri kaynaklı lipopolisakkarit (LPS) ve endojen olarak üretilen yüksek hareketlilikli grup kutusu 1 (HMGB1) dahil olmak üzere birden fazla farklı PAMP ve DAMP tarafından uyarılabilir (Beutler, 2000a; Beutler, 2000b; Erridge, 2010; Lu ve ark., 2008; Matsunaga ve ark., 2011). TLR-4 aktivasyonu, miyeloid farklılaşma proteini 2 (MD2), lipopolisakkarit bağlayıcı protein ve bir farklılaşma antijeni kümesi 14 (CD14) gibi aksesuar proteinlerle birlikte hareket eden spesifik ligandları içeren karmaşık bir süreçtir. TLR-4 artık yara iyileşmesi, doku yeniden şekillenmesi ve doğuştan gelen bağışıklıkta belirli rolleri olan deri bariyer fonksiyonunun önemli bir belirleyicisi olarak kabul edilmiştir. TLR'ler, patojenlere özgü çeşitli moleküler yapıları tanıyarak doğuştan gelen bağışıklık tepkisinde merkezi bir rol oynar. TLR-4, yardımcı reseptörü miyeloid farklılaşma-2 (MD-2) ile birlikte bakteriyel LPS'yi ve dolayısıyla Gram-negatif bakteriyel enfeksiyonları tanımasına rağmen, steril inflamasyon ve viral enfeksiyon dahil olmak üzere birçok başka patofizyolojik süreçte de önemli bir rol oynar (Beutler, 2000a; Beutler, 2000b; Erridge, 2010; Lu ve ark., 2008; Kawai ve Akira, 2010; Matsunaga ve ark., 2011; Miggin ve O'Neill, 2006; Park ve ark., 2009).

1.2.2. TLR-4 ve Başışıklık Sistemi Üzerindeki Rolü

Başışıklık sistemi, organizmanın patojenlere karşı savunma mekanizmasını oluşturan karmaşık bir yapıdır. Bu sistem, doğuştan gelen (innate) ve sonradan kazanılmış (adaptif) olmak üzere iki ana bileşenden oluşur. Doğuştan gelen başışıklık sistemi, patojenleri tanıma ve hızlı yanıt verme yeteneği ile ilk savunma hattını oluşturur. Bu sistemin temel bileşenlerinden biri, Toll-benzeri reseptörler (TLRs) olarak bilinen kalıtsal tanıma reseptörleridir. TLR'ler, patojenlere özgü moleküler desenleri (pathogen-associated molecular patterns) (PAMPs) tanıyarak başışıklık yanıtlarını başlatır (Kawai ve Akira, 2010). Bu reseptör ailesi, mikrobiyal bileşenler olan PAMP'leri tanıyarak başışıklık hücrelerinin hızlı tepkiler vermesini sağlar (Akira ve ark., 2006). TLR-4, bu reseptörler arasında en çok alışılan ve özellikle Gram-negatif bakterilerin lipopolisakkarit (LPS) yapısını tanıyan ilk tanımlanmış üye olarak dikkat eker (Poltorak ve ark., 1998). TLR-4, doğuştan gelen başışıklık yanıtının başlatılmasında ve düzenlenmesinde merkezi bir rol üstlenir. Yapısal özellikleri ve sinyal iletim yolları sayesinde hem savunma yanıtlarında hem de hastalıkların gelişiminde kilit bir moleküldür. Bu nedenle, TLR-4 ile ilişkili mekanizmaların anlaşılması ve hedeflenmesi, gelecekteki immunomodülatör tedaviler aısından büyük önem taşımaktadır. TLR-4, doğuştan gelen başışıklık sisteminin önemli bir bileşeni olarak, patojen tanıma ve inflamatuvar yanıtların başlatılmasında kritik rol oynar. Ancak, TLR-4'ün aşırı veya kontrolsüz aktivasyonu, eşitli hastalıkların patogeneğinde etkili olabilir. Bu nedenle, TLR-4'ün yapısı, sinyal iletim yolları ve hastalıklarla ilişkisi üzerine yapılan araştırmalar, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilecek kapasitededir (Erridge, 2010; Lu ve ark., 2008; Kawai ve Akira, 2010; Matsunaga ve ark., 2011; Park ve ark., 2009).

1.2.3. TLR-4'ün Klinik ve Terapötik Hedef Olarak Önemi

TLR-4, terapötik hedef olarak oldukça caziptir. Eritoran ve TAK-242 gibi TLR-4 antagonistleri, klinik alışmalarda sepsisi önlemek ve inflamasyonu baskılamak için test edilmektedir (Matsunaga ve ark., 2011). Aynı zamanda, TLR-4 agonistleri (örneğin Monophosphoryl lipid A), bazı aşı formülasyonlarında adjuvan olarak kullanılmaktadır (Reed ve ark., 2013).

1.2.4. TLR-4'ün Yapısı ve Lokalizasyonu

TLR-4, insanlarda 9. kromozom üzerinde bulunan bir gendir ve yaklaşık 839 amino asitten oluşan bir transmembran proteini kodlar. Reseptör, üç ana bölgeden oluşur: Leucine-rich repeat (LRR) bölgesi, transmembran bölge ve Toll/IL-1R (TIR) domain. TLR-4, özellikle makrofajlar, dendritik hücreler, monositler ve endotelial hücreler gibi doğuştan gelen bağışıklık sisteminin ana hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir (Beutler, 2000a; Beutler, 2000b; Kawai ve Akira, 2010; Matsunaga ve ark., 2011; Miggin ve O'Neill, 2006).

1.2.5. TLR-4'ün Sinyal İletim Mekanizmaları

TLR-4'ün aktivasyonu, LPS'nin reseptöre bağlanması ile başlar. Bu süreçte, iki yardımcı molekül olan CD14 ve MD-2 önemli rol oynar. LPS, CD14 aracılığıyla tanınır ve MD-2 ile kompleks oluşturarak TLR-4'ün aktivasyonunu sağlar (Lu ve ark., 2008). TLR-4 sinyali iki ana yol üzerinden gerçekleşir. Bunlar, MyD88-bağımlı ve TRIF-bağımlı yollardır. MyD88-bağımlı yol, hızlı inflamatuvar sitokinlerin (ör. TNF- α , IL-6) üretimini sağlar ve erken bağışıklık yanıtından sorumludur (Medzhitov ve ark., 1997). Buna karşın TRIF-bağımlı yol, tip I interferonların üretimini ve geç yanıtların gelişmesini sağlar (Yamamoto ve ark., 2003). Bu yolların aktivasyonu NF- κ B, MAPK ve IRF3 gibi transkripsiyon faktörlerinin nükleusa taşınmasıyla sonuçlanır. (Kawai ve Akira, 2010; Lu ve ark., 2008; Matsunaga ve ark., 2011; Park ve ark., 2009).

MyD88 bağımlı yolda, TLR-4'ün plazma membranında aktivasyonu ile başlar ve aşağıdaki adımları içerir: 1. MyD88 ve TIRAP adaptor proteinleri, TLR-4'ün TIR domainine bağlanır. 2. IRAK ailesi kinazlar aktive olur ve TRAF6 ile etkileşime girer. 3. TAK1 kompleksi aktive olur ve NF- κ B ile MAPK yollarını tetikler. 4. Bu süreç, proinflamatuvar sitokinlerin (örneğin, TNF- α , IL-6) üretimini sağlar (Lu ve ark., 2008).

TRIF bağımlı yolda ise, TLR-4'ün endozomal internalizasyonu sonrası aktive olur ve aşağıdaki adımları içerir: 1. TRAM adaptor proteini, TLR-4'ün TIR domainine bağlanır ve TRIF'i rekrute eder. 2. TRIF, TRAF3 ve TBK1 kinazlarını aktive eder. 3.

IRF3 transkripsiyon faktörü fosforile edilir ve nükleusa transloce olur. 4. Bu süreç, tip I interferonların (örneğin, IFN- β) üretimini sağlar (Lu ve ark., 2008).

1.2.6. Hücre Stresi, Nekroz ve Apoptozis

TLR-4 aktivasyonu, sadece immun yanıtla sınırlı değildir. Aşırı aktivasyon durumunda, TLR-4 sinyalleşmesi mitokondriyal stres, ROS üretimi ve kaspaz aktivasyonu yoluyla hücre ölümünü tetikleyebilir. Enfeksiyöz hastalıklarda bu mekanizmalar doku hasarına katkıda bulunur (Erridge, 2010).

Tablo 2.1. TLR-4'ün Enfeksiyonlardaki Etki Mekanizmaları

Etki Mekanizması	İlgili Yolak	Fonksiyon
İnflamasyonun başlatılması	MyD88-NF- κ B	Proinflamatuvar sitokin üretimi
Antiviral yanıtı katkı	TRIF-IRF3	Tip I interferon salınımı
Hücre ölümü ve doku hasarı	ROS üretimi, kaspaz aktivasyonu	Nekroz ve apoptozisin tetiklenmesi

1.2.7. TLR-4 ve Hastalıklarla İlişkisi

TLR-4 aktivasyonu, sepsis gibi akut enflamatuvar hastalıklardan otoimmün bozukluklara ve kanserlere kadar birçok hastalıkta önemli rol oynar. Sepsiste aşırı TLR-4 aktivasyonu "sitokin fırtınası"na yol açarak çoklu organ yetmezliğine neden olabilir (Beutler, 2000a; Beutler, 2000b). Ayrıca romatoid artrit ve inflamatuvar bağırsak hastalıklarında TLR-4'ün aşırı ifadesi patogeneze ilişkilendirilmiştir (O'Neill ve ark., 2009).

1.2.7.1 Sepsis

TLR-4'ün aşırı aktivasyonu, sistemik inflamatuvar yanıt sendromuna (SIRS) ve sepsise yol açabilir. LPS'nin TLR-4 üzerinden bağışıklık sistemini aşırı uyarak sitokin fırtınasına neden olduğu gösterilmiştir (Beutler, 2000a; Beutler, 2000b).

1.2.7.2. Otoimmün Hastalıklar

Rheumatoid artrit, lupus ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları gibi otoimmün hastalıklarda, TLR-4 ekspresyonunun arttığı ve bu durumun hastalık patogeneğinde rol oynadığı bildirilmiştir (Kawai ve Akira, 2010).

1.2.7.3. Kanser

TLR-4 aktivasyonu, tümör mikroçevresinde bağışıklık baskılanmasına katkıda bulunabileceği bildirilmiştir. Ayrıca, TLR-4'ün aktive olduğu ortamlarda tümör büyümesini destekleyen sitokinlerin salınımı artabileceği rapor edilmiştir (Kawai ve Akira, 2010).

1.2.7.4. Viral Enfeksiyonlar

SARS-CoV-2 gibi bazı virüslerin, TLR-4 üzerinden inflamatuvar yanıt başlattığına dair bulgular bulunmaktadır. Bu durum, COVID-19 vakalarında görülen yoğun inflamasyonu açıklayabilir (Kawai ve Akira, 2010).

1.2.8. TLR-4 Hedefli Tedaviler ve Klinik Yaklaşımlar

- **TLR-4 antagonistleri:** Sepsis gibi durumlarda bağışıklık sisteminin aşırı yanıtını baskılamak için geliştirilmiştir. Örneğin, Eritoran adlı molekül, TLR-4'ün LPS ile etkileşimini engelleyerek inflamasyonu azaltabilmektedir (Beutler, 2000a; Beutler, 2000b).
- **TLR-4 agonistleri:** Bağışıklık yanıtını artırmak amacıyla bazı aşı formülasyonlarında adjuvan olarak kullanılmaktadır. Örneğin, Monophosphoryl

lipid A (MPLA), TLR-4'ü aktive ederek bağışıklık yanıtını güçlendirmektedir (Kawai ve Akira, 2010).

- **Genetik yaklaşımlar:** Antisens RNA ve CRISPR/Cas9 teknolojileri kullanılarak TLR-4 ekspresyonunu kontrol altına almaya yönelik araştırmalar devam etmektedir (Kawai ve Akira, 2010).

1.3.1. HSP-70

Isı şoku proteinleri (Heat Shock Proteins, HSPs), çevresel ve fizyolojik stres koşullarına karşı hücrel yanıtın bir parçası olarak sentezlenen, evrimsel olarak korunan proteinlerdir. Bu proteinler arasında HSP-70 ailesi, en iyi karakterize edilmiş ve en yaygın ifade edilenlerden biridir (Mayer ve Bukau, 2005). HSP-70, proteinlerin doğru katlanması, yeniden katlanması ve bozulmuş proteinlerin uzaklaştırılması gibi fonksiyonlarla hücrel homeostazı sağlar (Hartl ve ark., 2011).

1.3.2. HSP-70'in Hastalıklardaki Rolü ve İlişkili Yolaklar

HSP-70'in ekspresyon seviyeleri, çeşitli hastalık durumlarında değişiklik göstermektedir. Alzheimer, Parkinson ve Huntington gibi nörodejeneratif hastalıklarda HSP-70, agregat oluşumu potansiyeli taşıyan proteinleri stabilize ederek hücrel hasarı azaltabilir (Muchowski ve Wacker, 2005). Bunun yanı sıra, kansere karşı verilen yanıtlarda da HSP-70'lerin immün modülasyon özelliği dikkat çekmektedir (Multhoff, 2007).

1.3.3. HSP-70'in Konak Hücre Savunmasındaki Rolü

HSP-70, hücrel strese karşı bir adaptasyon mekanizması olarak görev yapar. Enfeksiyonlarda, hücreler bakteriyel toksinlerin ve proinflatuar sitokinlerin etkisiyle proteotoksik stres altına girer. Bu durumda, HSP-70 ekspresyonu artar ve aşağıdaki işlevleri yerine getirir:

- Protein Katlanması: Yanlış katlanmış proteinlerin yeniden doğru yapıya getirilmesini sağlar.

- Apoptozisin Baskılanması: Kaspaz-3 ve kaspaz-9 gibi apoptozis yolaklarını inhibe ederek hücre ölümünü engeller.

- Sitokin Modülasyonu: TNF- α ve IL-1 β gibi inflamatuvar sitokinlerin aşırı üretimini baskılayabilir (Beere ve ark., 2000).

1.3.4. NF- κ B Sinyal Yolağının Modülasyonu

Enfeksiyon bölgesinde aktive olan NF- κ B yolağı, konak savunmasını başlatan temel mekanizmalardan biridir. HSP-70, I κ B'nin degradasyonunu önleyerek NF- κ B'nin nükleusa geçmesini engeller. Bu durum, aşırı sitokin üretiminin ve doku hasarının önüne geçilmesini sağlar (Asea, 2003).

1.3.5. DAMP Aktivitesi ve Bağışıklık Yanıtı

Hasar görmüş hücrelerden salınan HSP-70, DAMP (Damage-Associated Molecular Patterns) görevi görerek antijen sunucu hücrelerde Toll-like reseptör (özellikle TLR-4) üzerinden immün yanıtı aktive eder. Bu etki lokal inflamasyonu artırabilirken, aynı zamanda adaptif bağışıklığın aktive edilmesini de sağlar (Binder, 2004).

1.3.6. Chaperone-Mediated Autophagy (CMA)

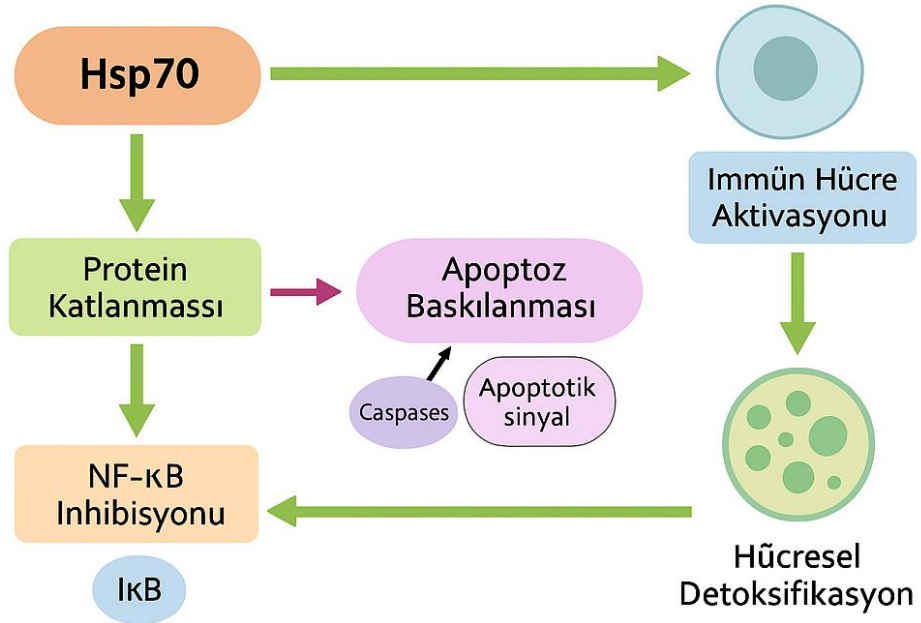
Enfeksiyonlarında hücre içi detoksifikasyonun sağlanması, enfekte veya hasarlı proteinlerin temizlenmesi açısından önemlidir. HSP-70, CMA yoluyla lizozomlara yönlendirilen proteinlerin taşınmasını düzenler. Bu mekanizma, enfekte hücrelerin daha sağlıklı bir metabolik profile ulaşmasına katkıda bulunur (Kaushik ve Cuervo, 2012).

1.3.7. Yara İyileşmesi ve Reepitelizasyon

HSP-70, epidermal hücre proliferasyonunu destekleyerek yara iyileşmesini hızlandırır. Bu süreç, özellikle EGF ve TGF- β gibi büyüme faktörlerinin aktivitesini artırarak gerçekleşir. Özellikle deri lezyonlarında yeniden epitel oluşumu için bu süreç kritik önemdedir (Udono ve Srivastava, 1993).

Tablo 2.2 Hastalıklarda HSP-70'in Etki Mekanizmaları

Etki Mekanizması	İlgili Hücresel Yolak	Fonksiyon
Protein Katlanması	HSP-70-ATP döngüsü	Hücre stresin azaltılması
Apoptoz Baskılanması	Caspase inhibisyonu	Hücre sağkalımının artırılması
İnflamasyon Modülasyonu	NF-κB yolağı	Aşırı immun yanıtın baskılanması
Antijen Sunumu ve İmmünite	DAMP sinyalleşmesi, TLR-4	Adaptif immun sistem aktivasyonu
Yara İyileşmesi	EGF/TGF-β aktivasyonu	Reepitelizasyonun hızlandırılması



Şekil 2.1 HSP-70'in enfeksiyon patogenezindeki temel işlevsel yolları. Görsel yazar tarafından oluşturulmuştur; bilimsel içerik, Asea (2003), Binder (2004), Beere ve diğerleri (2000), Kaushik ve Cuervo (2012) ve Udonon ve Srivastava (1993) uyarlanmıştır.

1.3.8.HSP-70'in Moleküler Yapısı

HSP-70 proteini iki temel domen içerir: ATP bağlayan N-terminal domen ve substrat bağlayan C-terminal domen. Bu yapısal özellikler, substrat proteinlerin bağlanması ve salınması sürecinin ATP-hidroksilaz aktivitesi ile düzenlenmesini sağlar (Zuiderweg ve ark., 2013). HSP-70 ailesi aynı zamanda ko-şaperon proteinlerle etkileşerek fonksiyonel verimliliğini artırır (Kampinga ve Craig, 2010).

1.3.9. HSP-70'in Fizyolojik Fonksiyonları

HSP-70, protein homeostazının sürdürülmesinin yanı sıra, apoptozun düzenlenmesi, antijen sunumu ve immün yanıt gibi birçok biyolojik sürece katkı sağlar (Evans ve ark., 2010). Özellikle stres altındaki hücrelerde, HSP-70 ekspresyonu artarak proteotoksik hasarların önüne geçer (Kiang ve Tsokos, 1998).

1.3.10. HSP-70 ve Klinik ve Terapötik Potansiyel

HSP-70, çeşitli hastalıklar için potansiyel bir terapötik hedef olarak değerlendirilmektedir. Örneğin, HSP-70 indükleyici moleküller nörodejeneratif hastalıkların ilerlemesini yavaşlatabilirken, inhibitörler ise kanser tedavisinde kullanılabilir (Pockley ve ark., 2008).

HSP-70 hem fizyolojik stres yanıtları hem de hastalık patogenezi açısından merkezi bir rol oynamaktadır. Moleküler yapısı ve çok yönlü fonksiyonları sayesinde HSP-70 hem temel bilimsel araştırmalarda hem de klinik uygulamalarda önemli bir hedef olarak öne çıkmaktadır.

1.4.1.Kaspaz-3 ve Apoptoziste Merkezi Rol ve Klinik Önemi

Apoptozis, programlı hücre ölümü olarak bilinen ve doku homeostazının korunmasında hayati rol oynayan kontrollü bir biyolojik süreçtir. Bu süreç, kaspazlar olarak adlandırılan sistein proteazların etkinliği ile yürütülür (Elmore, 2007). Kaspaz

ailesinin üyelerinden biri olan kaspaz-3, hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptozis yollarının ortak icracısı konumundadır (Porter ve Jänicke, 1999).

1.4.2. Kaspaz-3'ün Üretimi ve Aktivasyonu

Kaspaz-3, inaktif prokaspaz-3 olarak sentezlenir ve apoptotik sinyallerin etkisiyle aktif forma (p17/p12 alt üniteleri) dönüşür. Bu aktivasyon genellikle upstream kaspazlar (kaspaz-8 veya kaspaz-9) aracılığıyla gerçekleşir (Riedl ve Shi, 2004). İntrinsik yol, mitokondriden salınan sitokrom c'nin apoptozom kompleksini oluşturması ve kaspaz-9'un aktive olmasıyla başlarken; ekstrinsik yol, Fas/TNF reseptörleri gibi ölüm reseptörleri aracılığıyla kaspaz-8'in aktive edilmesini sağlar (Taylor ve ark., 2008).

1.4.3. Kaspaz-3'ün Hastalıklardaki Rolü ve Yolakları

Kaspaz-3 aktivitesindeki dengesizlik, nörodejeneratif hastalıklar, kanser, iskemik hasar ve otoimmün hastalıklar gibi pek çok patolojik durumda rol oynamaktadır (Porter ve Jänicke, 1999). Özellikle Alzheimer ve Parkinson hastalığında artmış kaspaz-3 aktivitesi, nöron kaybı ve sinaptik bozulma ile ilişkilendirilmiştir (Porter ve Jänicke, 1999; Tatton ve ark., 2001).

1.4.4. Kaspaz-3'ün Apoptozis Yolağındaki Temel Rolü

Apoptozis, hücre hasarın kontrolsüz doku harabiyetine dönüşmeden sonlandırılmasını sağlayan bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Kaspaz-3, hem mitokondriyal (intrinsik) hem de reseptör aracılı (ekstrinsik) yollardan aktive edilerek hücre iskeletini ve DNA'yı parçalayan efektör bir proteaz olarak görev yapar (Elmore, 2007). Bakteriyel enfeksiyonlarda, bu yolak enfekte hücrelerin kontrollü olarak ortadan kaldırılmasını sağlar.

1.4.5. Doku Yenilenmesi ve Rejeneratif Rol

Kaspaz-3 aktivasyonu yalnızca hücre ölümü ile sınırlı değildir. Araştırmalar, düşük düzeyde kaspaz-3 aktivitesinin doku rejenerasyonunu teşvik edebileceğini

göstermektedir. Bu özelliği ile yara iyileşmesi ve reepitelizasyon sürecinde önemli bir rol üstlenebileceği bildirilmiştir (Li ve ark., 2010).

Tablo 2.3 Kaspaz-3'ün Hastalıklarda Etki Mekanizmaları

Etki Mekanizması	İlgili Yolak	Fonksiyon
Apoptozun İndüklenmesi	Mitokondriyal ve Reseptör yolağı	Enfekte hücrelerin yok edilmesi
İnflamatuvar Düzenleme	TNF- α aracılı sinyal	Enfeksiyonun sınırlanması
Doku Rejenerasyonu	Düşük düzey Kaspaz-3 aktivitesi	Yara iyileşmesinin desteklenmesi

1.4.6. Kaspaz-3' in Fonksiyonel Rolü

Kaspaz-3, apoptozisin morfolojik ve biyokimyasal belirtilerinden sorumludur. Bu enzim, PARP (poly ADP-ribose polymerase), DNA protein kinaz ve ICAD (inhibitor of caspase-activated DNase) gibi hedef proteinleri parçalayarak DNA çatlama ve hücre çekirdeğinin bütünlüğünün bozulmasını sağlar (Fernandes-Alnemri ve ark., 1994; Slee ve ark., 2001).

1.4.7. Klinik ve Terapötik Potansiyel

Kaspaz-3, apoptozise aracılık eden başlıca icracı kaspaz olduğu için, terapötik hedef olarak önem kazanmıştır. Kaspaz inhibitörleri, özellikle nörodejeneratif hastalıklar ve iskemik durumlarda hücre kaybı önlemeye yönelik stratejilerde incelenmektedir (Schotte ve ark., 1999).

Bu çalışmanın amacı ektima hastalığında lezyonlu bölgelerde TLR-4, HSP-70 ve kaspaz-3 ekspresyonlarının immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesi ve bu belirteçlerin hastalık patojenezindeki rollerinin belirlenmesidir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Histopatolojik Yöntem

Hastalıklı hayvanlardan lezyonlu bölgelerden alınan biyopsi örnekleri ile ölen hayvanlardan nekropsi sırasında alınan lezyonlu ağız, dudak ve deri dokusu örnekleri %10 tamponlu formaldehit solüsyonda tespit edildi. Her gün solüsyon değiştirilerek örneklerin tamamen tespit olmaları için üç gün boyunca bu işlem tekrarlandı. Üç gün sonra tüm örnekler trimlenerek doku takip kasetlerine alındı. Bu aşamada hayvan numaraları kasetler üzerine dikkatlice yazıldı. Akşam takip işlemine alınana kadar tüm örneklerin bulunduğu kasetler tekrar formaldehit solüsyonunda bekletildi. Akşam üzeri kasetler formaldehit solüsyonundan alınarak rutin doku prosedürüne alındı. Bu işlem için tam otomatik kapalı sistem doku takip cihazı (Leica ASP300S; Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) kullanıldı. Tüm gece boyunca cihaz vakumlu doku takip programına ayarlanarak çalıştırıldı. Cihazın vakumlu programı ayarında kullanılması sert ve lezyonlu bölgelerin tüm tabakalarına solüsyonların nüfuz etmesini ve tüm tabakaları ile lezyonlu bölgelerin aynı ölçüde solüsyonların etkisinden geçmesini sağladı. Rutin doku takip prosedüründe örneklerin bulunduğu kasetler ilk aşamada derecesi düşük olan ve %70'likten başlayan alkol serilerinden %100'lük saf alkol serisine kadar dereceleri artan 10 seri alkolden geçirildi. Böylelikle dokularda bulunan sularının çekilmesi sağlandı. Bu aşamanın ardından iki seri ksilolden geçirilen örneklerdeki yağın eritilmesi ve dokudan uzaklaştırılması işlemi tamamlandı. Bu aşamaların ardından sıcak parafin aşamasına geçildi ve lezyonlu dokularda su ve yağın çekilmesiyle oluşan boşluklara sıcak parafinin yerleşmesi ve dokunun normal görünümünü koruması sağlandı. Ertesi gün sabahdan doku takip aşaması biten örnekler doku takip cihazının haznesinden çıkarılarak bu kez doku gömme cihazının (Leica Histocore Arcadia H) (Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) sıcak ünitesine alındı. Bu bölmede eritilmiş sıcak parafin ile özel metal blokaj kalıplarına yerleştirilen örneklerin blokaj işlemleri gerçekleştirildi. Blokaj işlemi sırasında örneklerin yüzeye dik ve tüm tabakaları aynı hizaya gelecek şekilde düzgün bir pozisyonda sıcak parafin içinde sabitlenmesine ve bu konumda donmasına azami gayret gösterildi. Blokajları tamamlanan bloklarının tamamı doku gömme cihazının bu kez soğuk tablalı bölümüne yerleştirilerek önce soğumaları sonra da parafinin donması sağlandı. Bu cihazın soğuk

tablası üzerinde tüm bloklar yaklaşık olarak 2 saat kadar tutuldu ve böylelikle parafinin tamamen soğuması, donması ve sertleşerek blokajın tamamlanması gerçekleştirildi. Donarak metal blokaj kalıplarından kolaylıkla ayrılacak hale gelen bloklar kalıplardan ayrıldı ve kesit alma aşamasına kadar +4°C’de buzdolabında saklandı. Kesit alma aşaması için tüm bloklar buzdolabından alınarak blokaj ünitesinde soğuk tabla üzerine yerleştirildi ve burada 2 saat kadar tutularak soğutulması sağlandı. Yeteri kadar soğutulan parafin bloklardan hem histopatolojik hem de immunohistokimyasal incelemeler için tam otomatik rotary mikrotom cihazıyla (Leica 2155, Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) 5 µm kalınlıkta seri kesitler alındı. Normal lamlara alınan bir seri kesit hematoksisilen-eozin (HE) ile boyanarak histopatolojik olarak değerlendirildi. Polilizinli lamlara alınan 3 seri kesit ise immunohistokimyasal boyamalar için kullanıldı. Tüm kesitler kurumaları ve lamaların üzerine tamamen yapışmaları için bir gece boyunca oda ısısında kurumaya bırakıldı.

Ertesi gün normal lama alınan bir seri kesit HE boyama aşaması için boyama köprülerine dikkatlice dizildi ve boyama prosedürüne alındı. Boyamaya geçilmeden önce köprüye dizilen preparatlar kesitler üzerindeki parafinin erimesi ve kesitlerin lamaların üzerine daha iyi tutunmaları için önceden 60°C’ye kadar ısıtılmış etüv içerisinde 1,5 saat kadar bırakıldı. Bu sürenin sonunda etüvden çıkarılan preparatlar boyama ünitesinin olduğu havalandırılmalı kabine alındı. Boyama ünitesinde ilk olarak kesitler üzerinde bulunan parafin kalıntılarının tamamen uzaklaştırılması ve kesitlerin boya almasının sağlanması için boyama köprülerinde bulunan kesitler yaklaşık olarak 30’ar dakika süreler ile 3 ayrı ksilol serisinden geçirilerek deparafinizasyon aşaması tamamlandı. Bu aşamadan sonra dereceleri gitgide azalan ve sırasıyla %100’lük saf alkolden başlanarak 96, 90, 80 ve 70’lik alkollere geçirilen kesitler tekrar su verilerek ve rehidre edildi. Rehidre edilen örnekler Harris hematoksisilenle yaklaşık 15 dakika ve hemen ardından eozinle yaklaşık 3 dakika süreyle sürekli boyanma şiddeti kontrol edilerek boyandı. Boyaması tamamlanan kesitler bu kez dehidre olmaları için dereceleri artan ve sırasıyla %70’likten başlayarak, 80, 90, 96 ve 100’lük saf alkollere kadar geçirilerek kesitlerdeki suların tekrar alınması sağlandı. Ardından ksilol serilerine alınan kesitler burada parlatıldı ve takiben üzerlerine entellan damlatılarak lamel yapıştırıldı. Böylelikle boyama aşaması da tamamlanmış olan preparatlar bir gün boyunca kurumaya

bırakıldı. Böylelikle kuruyan preparatlar mikroskop altında incelenmeye hazır hale getirildi. Tüm preparatlar tek tek Olympus CX21 model ışık mikroskop altında lezyonlu bölgelerdeki reaksiyonlar açısından incelendi. Tüm örneklerden trinoküler mikroskop ve görüntüleme programları ile mikroskopik dijital fotoğraflar alınarak bilgisayar ortamına aktarıldı.

2.2. İmmunohistokimya Metodu

Bu çalışmada immunoperoksidaz inceleme için streptoavidin-biotin kompleks peroksidaz metodu kullanıldı. İmmunohistokimyasal inceleme için doku örnekleri kaspaz-3 ([Caspase 3/P17/P19 Polyclonal antibody], (Cat No. 19677-1-AP)); HSP-70 (HSP70 Polyclonal antibody, (Cat No. 10995-1-AP) ve TLR-4 (TLR-4 Monoclonal antibody, (Cat No. 66350-1-Ig) ile boyandı. Her üç primer antikor da Proteintech (ABD) firmasından satın alındı ve 1/100 oranında sukandırılarak kullanıldı. Sekonder kit olarak EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC kit (ab80436) ve kromojen olarak 3,3'-diaminobenzidine (DAB) kullanıldı (Abcam, İngiltere). Çalışmada negatif kontroller olarak kullanılan kesitler için dokular primer antikor serisi sırasında onun yerine antikor sulandırma sıvılarıyla inkübasyona bırakıldı.

İmmunohistokimyasal değerlendirmeler amacıyla alınan ve polilizinli lamlara çekilen 3 ayrı seri kesitte bir gün süreyle oda ısısında kurutulduktan sonra 60°C'lik etüvde 1,5 saat kadar tutuldu ve bu sürenin sonunda etüvden alındı. Kesitler üzerindeki parafin artıklarının eritilmesi için tüm kesitler ksilol serilerinden geçirilerek deparafinize edildi. Ardından dereceleri azalan ve %100'lük saf alkolden başlanarak %70'lik alkollere kadar alkol serilerinden geçirilerek rehidre edildi. Bu aşamanın ardından tüm kesitler distile suya alınarak burada 10 dakika kadar bekletildi. Daha sonra tüm kesitler endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak amacıyla metanol ile hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 20 dakikalık bir süre ile inkübasyona bırakıldı. Bu aşamanın ardından tüm kesitler 2 defa 10'ar dakikalık sürelerle fosfat tampon solüsyonu (PBS) içine alınarak yıkama işlemi yapıldı. Bunun ardından tüm kesitler mikrodalga fırına alınarak sitrat tampon solüsyonu (pH 6) ile 700'lük ayarda 5 dakika sürelerle iki defa kaynatma işlemine tabi tutuldular. Bu işlemin ardından tüm kesitler 10'ar dakika sürelerle 2 defa PBS içinde yıkamaya alındı. Daha

sonra non spesifik boyanmaları önlemek amacıyla normal serum ile yaklaşık 20 dakika inkübasyona alındı. Bu aşamanın ardından kesitlerin üzerindeki fazla normal serum atılarak yıkama işlemi yapılmadan kesitler üzerine primer serumlar damlatıldı ve +4°C’de buzdolabına alınarak gece boyunca inkübasyona alındı. Bu aşamanın ardından tüm kesitler yukarıda detayları verilen şekil ve sürelerle PBS içinde yıkamaya bırakıldı. Daha sonra biotinli serumla 30 dakika kadar bir süre ile inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda tüm kesitler tekrar PBS içine alınarak 2 defa 10’ar dakikalık süreler ile yıkama işlemine tabi tutuldu. Bu işlemin ardından tüm kesitler streptoavidin solüsyonu ile 30 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra aynı şekil ve süreyle PBS içinde yıkamaya alındı. Ardından 1ml sulandırma solüsyonu için 1 damla substrat şeklinde yeni hazırlanan DAB (3,3 diaminobenzidine) kromojen ile kontrollü şekilde inkübasyona bırakılarak reaksiyonun görünür hale gelmesi sağlandı. Bu aşama mikroskop altında her bir antikor için ayrı ayrı ve sürekli kontrol edilerek yapıldı. Immunohistokimyasal boyama prosedürünün mikrodalga fırın içinde kaynatma aşamasının dışındaki bütün aşamalar nemli kamara içinde yapıldı. Bu aşamanın tamamlanmasından sonra tüm kesitler zıt boyama için Harris hematoksilen ile 5 dakika kadar kontrollü olarak boyandı. Dehidrasyon aşaması ardından ksilol ile parlatılan kesitler üzerine entellan damlatıldı ve lamel kapatıldı. Ardında 1 gün süreyle oda sıcaklığında bekletilen preparatlar kurutuldu ve ışık mikroskopunda incelenecek hale getirildi.

İmmunohistokimyasal boyanmalar 0-3 arasında skorlandı. Kaspaz-3, TLR-4 ve HSP-70 immunohistokimyasal boyaması yapılan lezyonlu bölge kesitleri x20 objektif altında immün boyanmaların yoğunluğuna ve dağılımına göre değerlendirildi. Pozitif boyanma yok ise 0, kesitte sadece bir bölgeye sınırlı hafif ya da orta derecede boyanma var ise +1, kesitte 2-3 bölgede hafif ya da orta derecede boyanma var ise +2 ve kesitte değişen derecelerde yaygın boyanmalar var ise +3 olarak değerlendirildi. Skorlamalarda ImageJ programı (version 1.48, National Institutes of Health, Bethesda, ABD) ve morfometrik analizler ve mikrofotografi için Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System (Olympus Co., Tokyo, Japan) kullanıldı.

2.3. İstatistik analizler

İstatistiksel analizler için SPSS 19.00 programı kullanıldı. Pozitif hücre sayısı için ve grafiklerin oluşturulmasında ayrıca Graphpad prism programdan yararlanıldı. Öncelikle, verilerin dağılım normalliği Shapiro-Wilk testi ile analiz edildi. Verilerin normal dağılım gösterdiği ($P>0.05$) tespit edildiğinden, gruplar arası karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı. Gruplar arası farkların değerlendirilmesi için Duncan testi kullanıldı ve $P < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



3. BULGULAR

3.1. Makroskopik Bulgular

Çalışmaya dahil edilen hayvanların 29 oğlak ve 8 adedi kuzuydu. Lezyonlar özellikle dudaklarda ve kommisuralara yakın kısımlarda lokalize olmuştu. Bazı şiddetli olgularda mermeye kadar uzanan lezyonlar görüldü. Hafif olaylarda hiperemi ve ödem ile hafif kabuklanmalar gözlemlendi. Ancak şiddetli olaylarda hayvanların ağızlarını kapatmasını engelleyecek kadar sertleşmiş kabuklar, aşırı şişkinlik ve çatlaklar ile kanamalar görüldü. Özellikle şiddetli olgularda sekonder enfeksiyonlar sebebiyle lezyonların dil ve damağa kadar ilerlediği de saptandı. Yer yer purulent eksudat veya pseudomembranların lezyonlu bölgelerde belirgin şekilde bulunduğu görüldü. Bu hayvanlarda gıda alınınımının azalmasına bağlı olarak zayıflamalar da saptandı. Bazı hayvanlarda ve özellikle şiddetli olgularda ağız kokusu da dikkati çekti. Hastalığın ensik dudak bölgesine lokalize olduğu ve 3 aylıktan küçük yavruarda insidansın arttığı saptandı. (Şekil 3.1 – 3.6).



Şekil 3.1. Ektimal bir oğlağın ağız ve dildeki lezyonlarının makroskopik görünümü



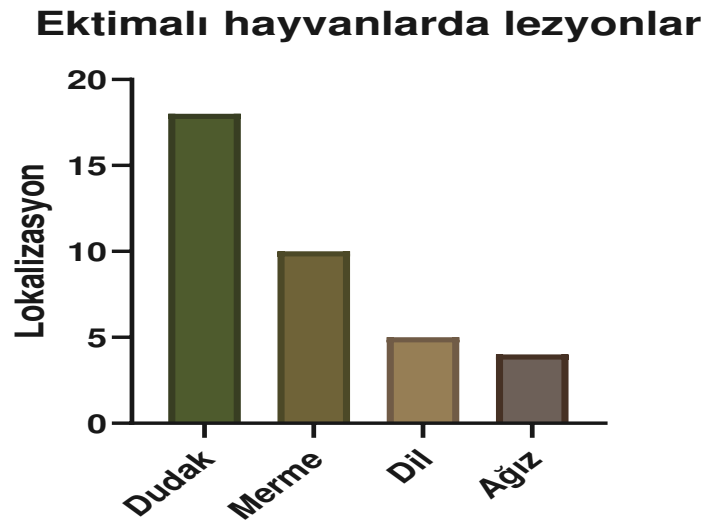
Şekil 3.2. Ektimalı keçilerde dudak ve mermesinde kabuklu proliferatif lezyonlar lezyonlarının makroskobik görünümü



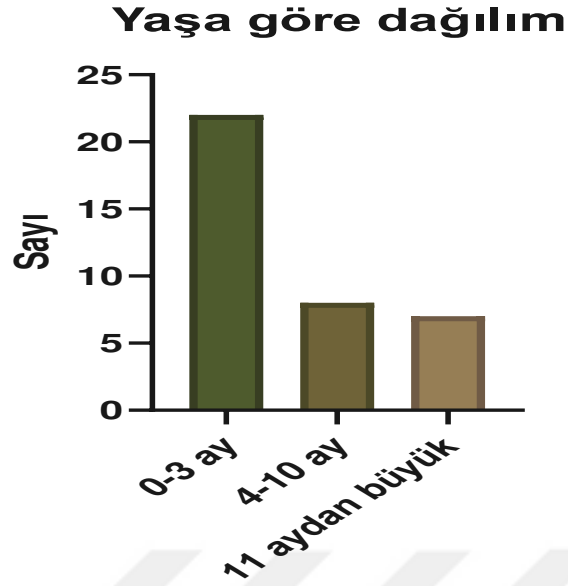
Şekil 3.3. Ektimalı başka keçilerde dudak ve mermesinde proliferatif lezyonlar lezyonlarının makroskobik görünümü



Şekil 3.4. Ektimalı keçilerde dudak ve çene lezyonları ile kabuk uzaklaştırıldıktan sonraki görünüşleri



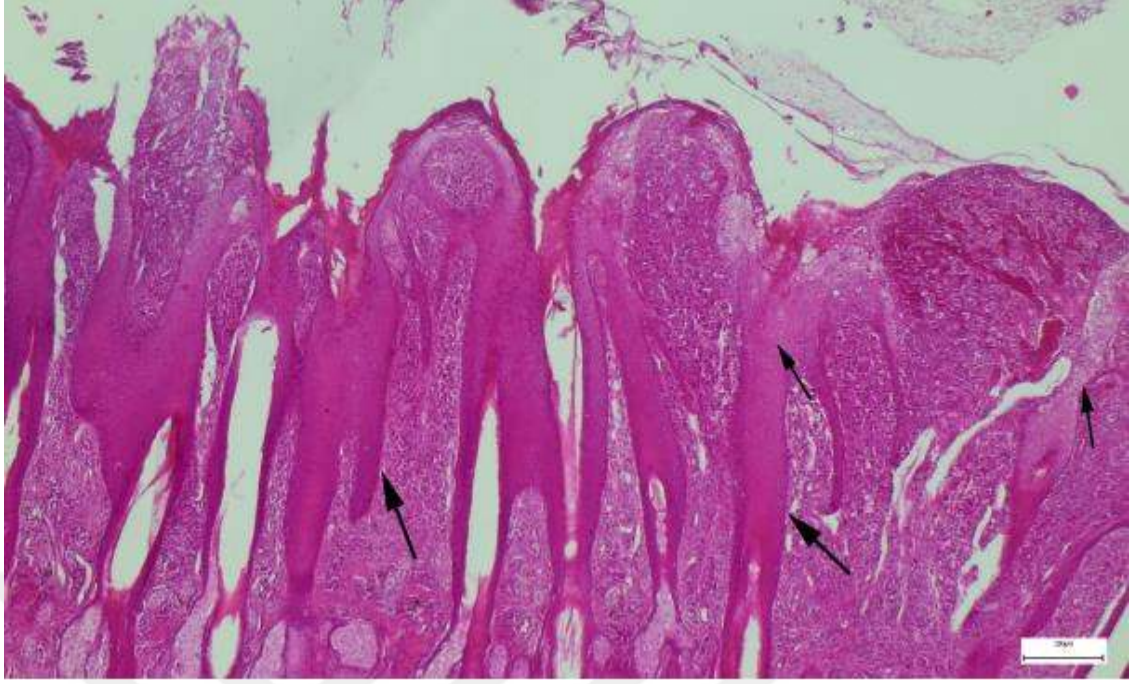
Şekil 3.5. Çalışmadaki hayvanların lezyonlarının dağılımı



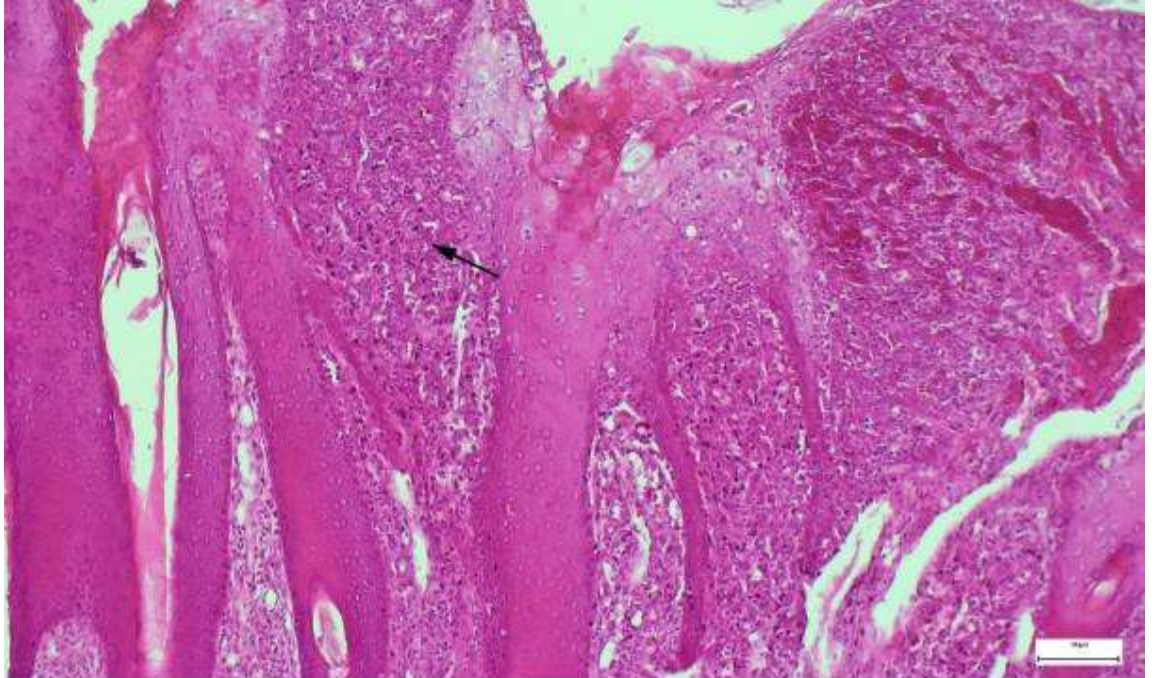
Şekil 3.6. Çalışmadaki hayvanların yaşıa göre dağılımı

3.2. Mikroskopik Bulgular

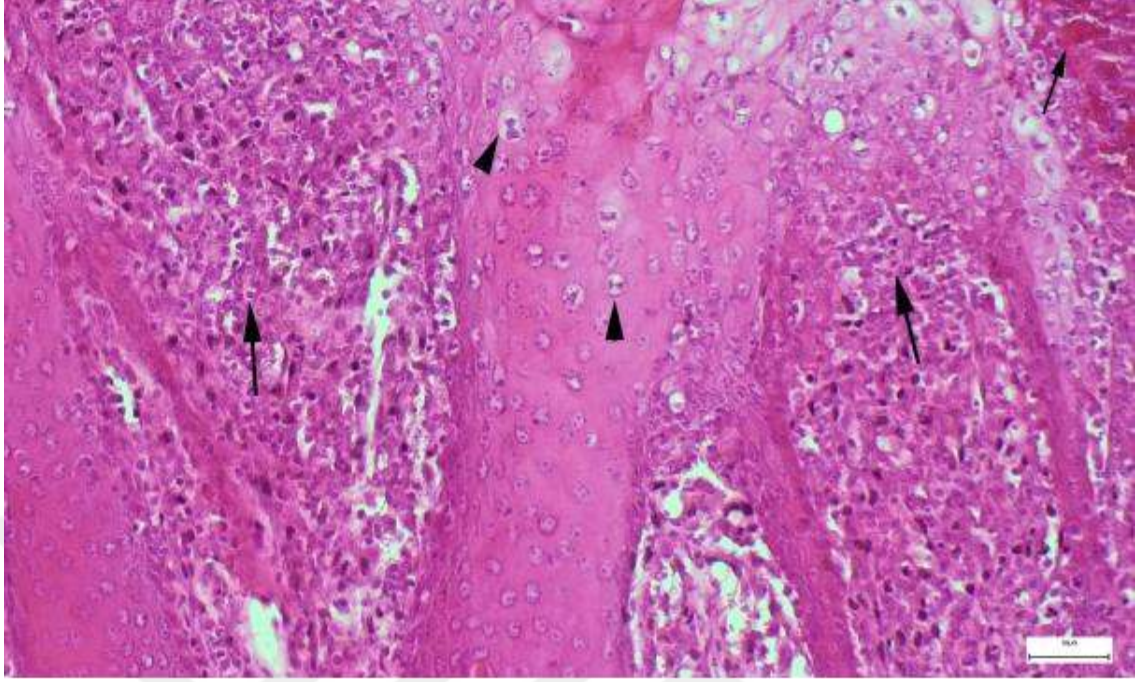
Çalışmadaki tüm olgularda karakteristik olarak epiteliyal proliferasyon, hiperkeratozis ve akantozis gözlemlendi. Bu bulgular, epidermisin artmış hücre üretimi ve kalınlaşmasıyla uyumlu olup, hastalığın kronikleşme eğilimini düşündürdü. Özellikle epidermisteki hücrelerden intraepiteliyal balonumsu dejenerasyonlar, hücre içi ödem sonucu oluşan vakuolizasyonlar sıklıkla saptandı. Epidermisin belirgin şekilde proliferasyona uğrayarak dermise doğru girinti ve çıkıntılar (rete pegs) oluşturduğu dikkati çekti. Bu durum, epidermal hücrelerin inflamasyona yanıt olarak çoğaldığını ve bazal membrana doğru düzensiz bir büyüme gösterdiğini düşündürdü. Çok sayıda vakada, epidermal hücrelerde tipik intrasitoplazmik eozinofilik inklüzyon cisimcikleri gözlemlendi. Ayrıca olguların çoğunda sekonder bakteriyel enfeksiyona bağlı olarak bakteri kümeleri dikkati çekti (Şekil 3.7- 3.14).



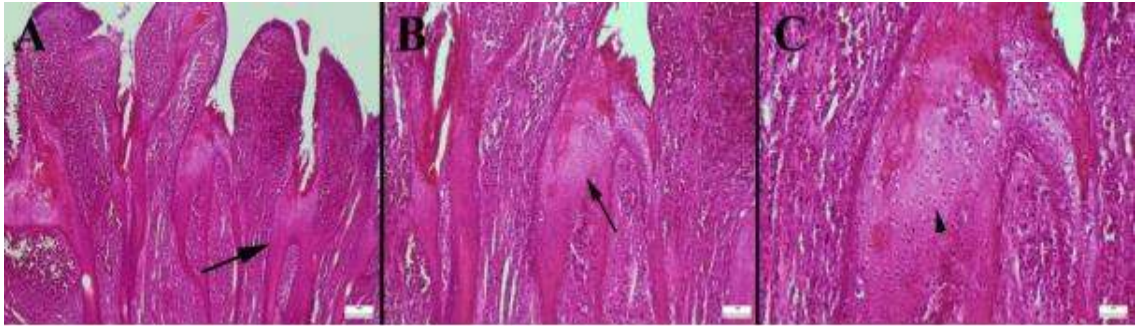
Şekil 3.7. Bir oğlaka dudakta şekillenmiş ektima olgusu olgusunun mikroskopik görünümü, belirgin epitelyamatöz hiperplazi (kalın oklar) ve ortokeratozis (ince oklar), HE, Bar= 200μm.



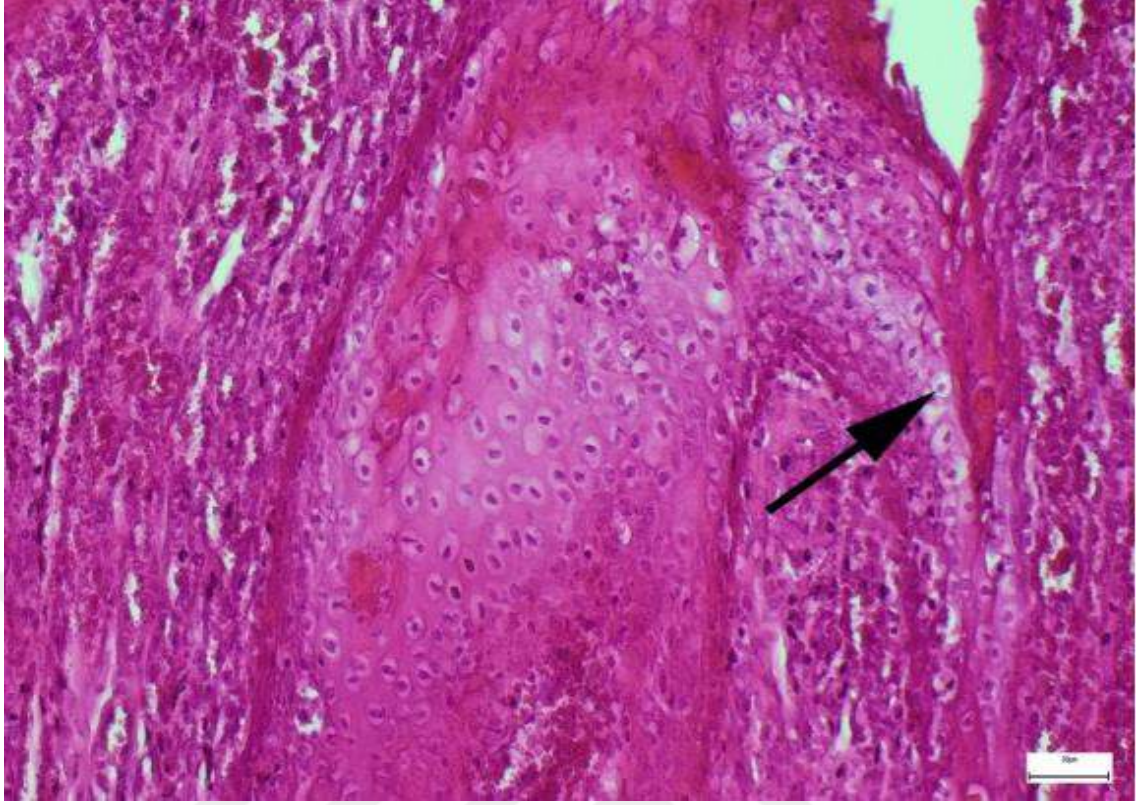
Şekil 3.8 Yukarıdaki resmin büyütülmüş görüntüsü, lezyonlu bölgede yangısal hücre infiltrasyonları (ok), HE, Bar= 100μm.



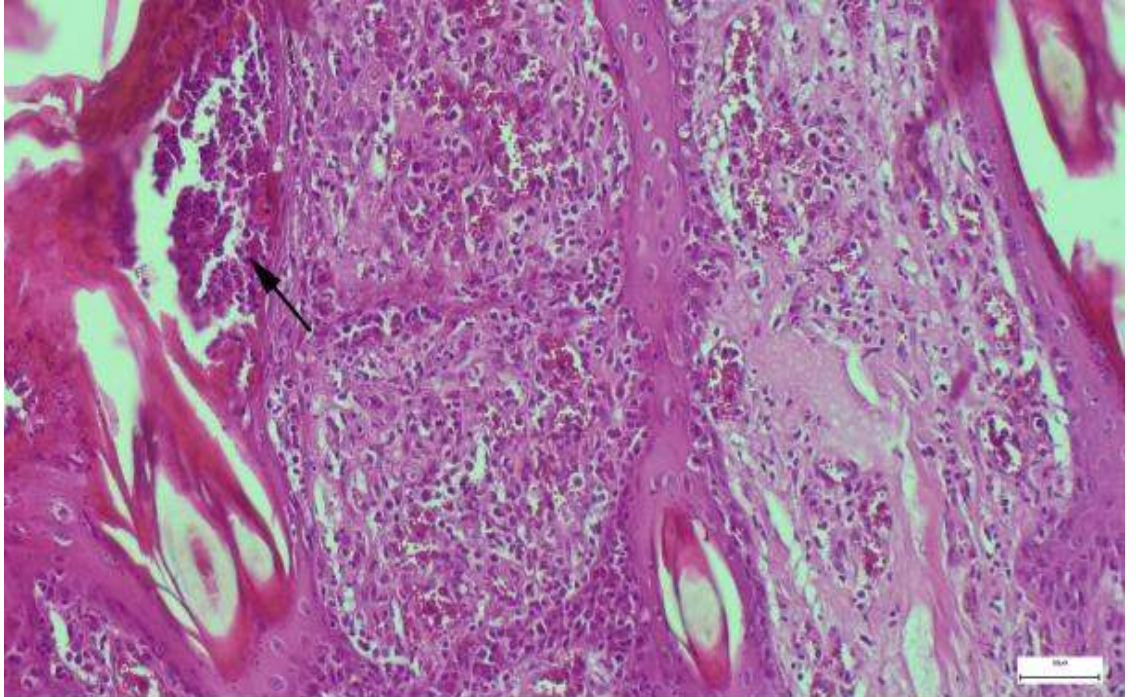
Şekil 3.9. Aynı alanını daha yakından görünümü, yangısal hücreler (kalın oklar), kanama odakları (ince ok) ve epitellerde balonumsu dejenerasyonlar (ok başları), HE, Bar= 50µm.



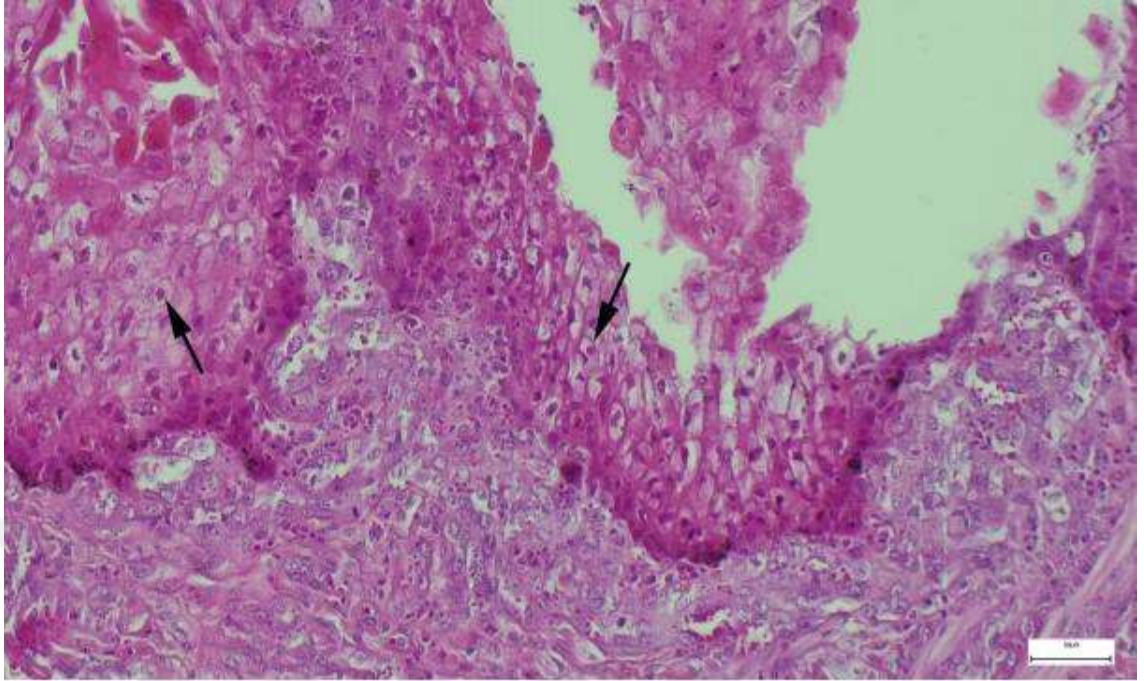
Şekil 3.10. Bir oğlaktaki ektima olgusunun histopatolojik görünümü. (A) Tipik epitelyamatöz hiperplazi (kalın ok). (B) Belirgin ortokeratozis (ince ok) ve (C) tipik balonumsu dejenerasyona uğramış epitel hücreleri (ok başı), HE, Barlar A için 200µm, B için 100µm, C için 50µm.



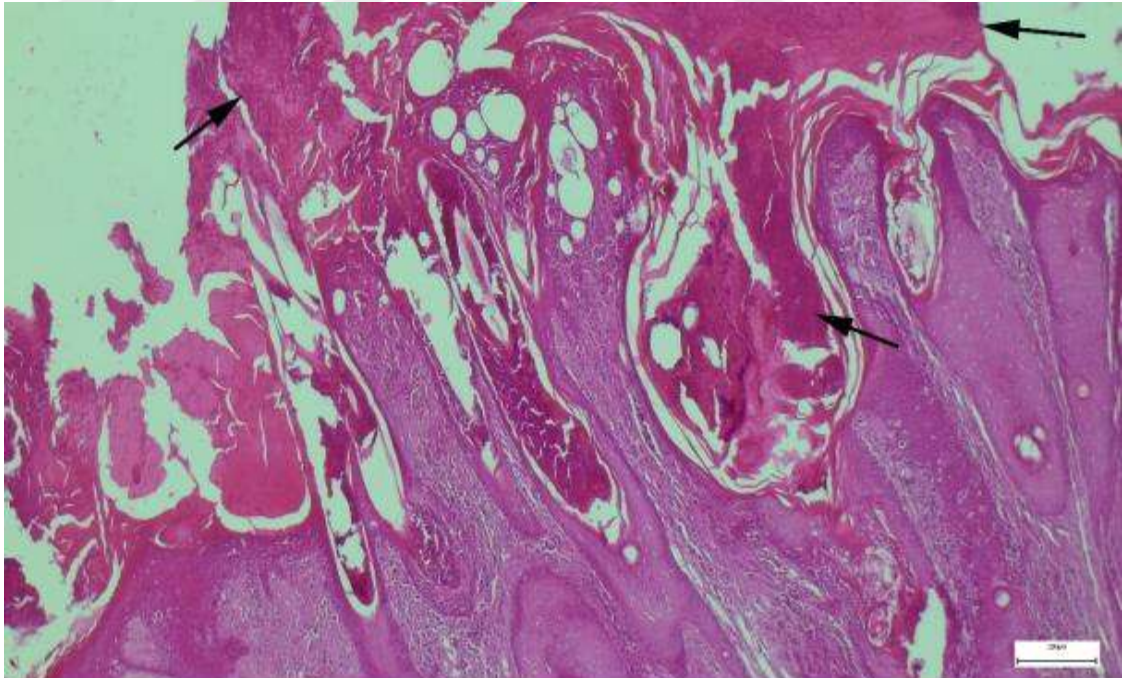
Şekil 3.11. Yukarıdaki olgunun büyütülmüş görünümü, intrasitoplazmik inklüzyon cisimcikleri (ok), HE, Bar= 50µm.



Şekil 3.12. Bir başka oğlaktaki ektima olgusunda püstül oluşumu (ok), HE, Bar= 50µm.



Şekil 3.13. Bir başka oğlaktaki lezyonlarda belirgin intrasitoplazmik inklüzyon cisimciklerinin (oklar) görünümü, HE, Bar= 50µm.

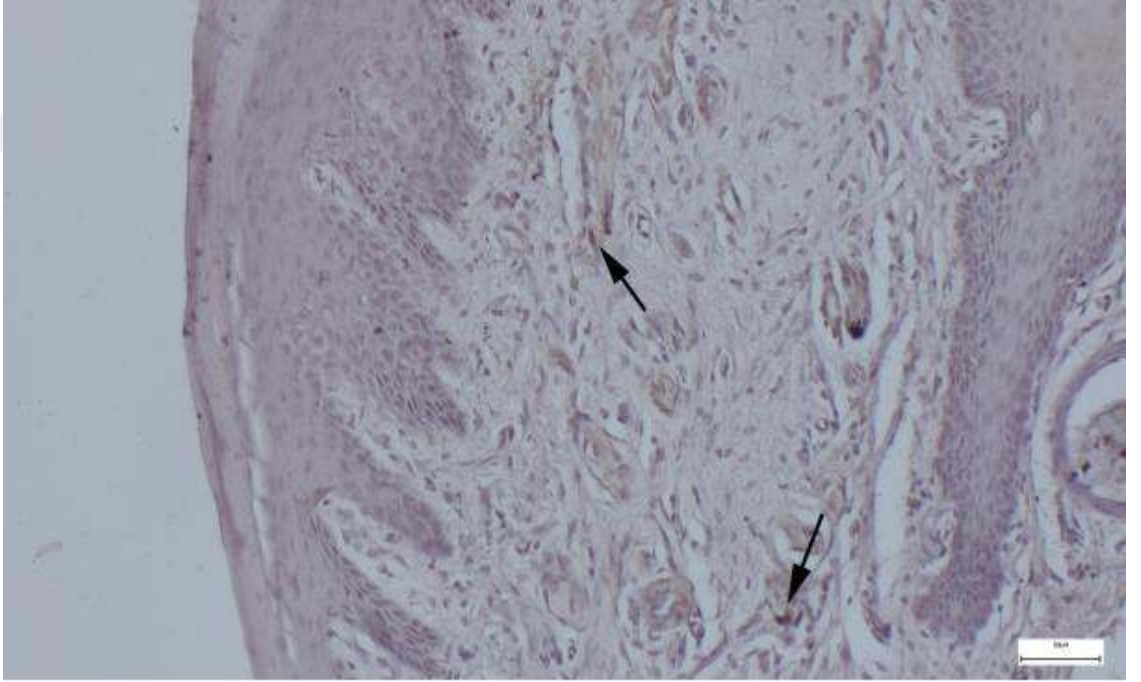


Şekil 3.14. Bir ektima olgusunda lezyonun üzerinde kalın bir kabuk oluşumu, HE, Bar= 200µm.

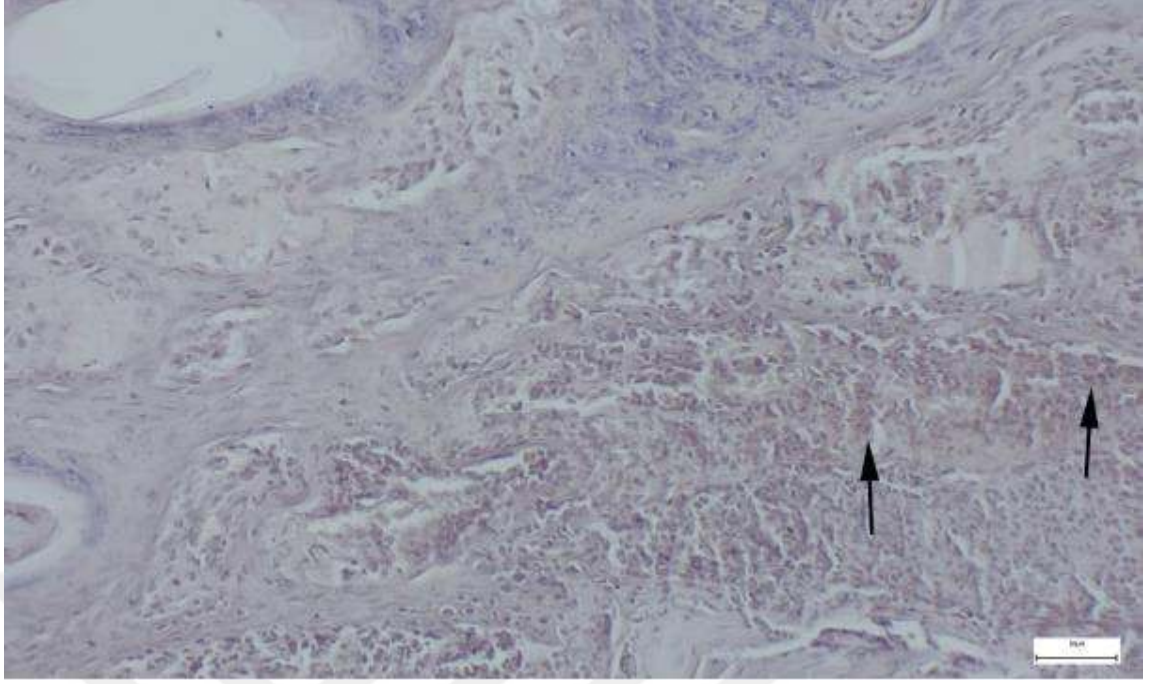
3.3.İmmunohistokimyasal Bulgular

3.3.1. HSP-70 İmmunohistokimyasal Bulguları

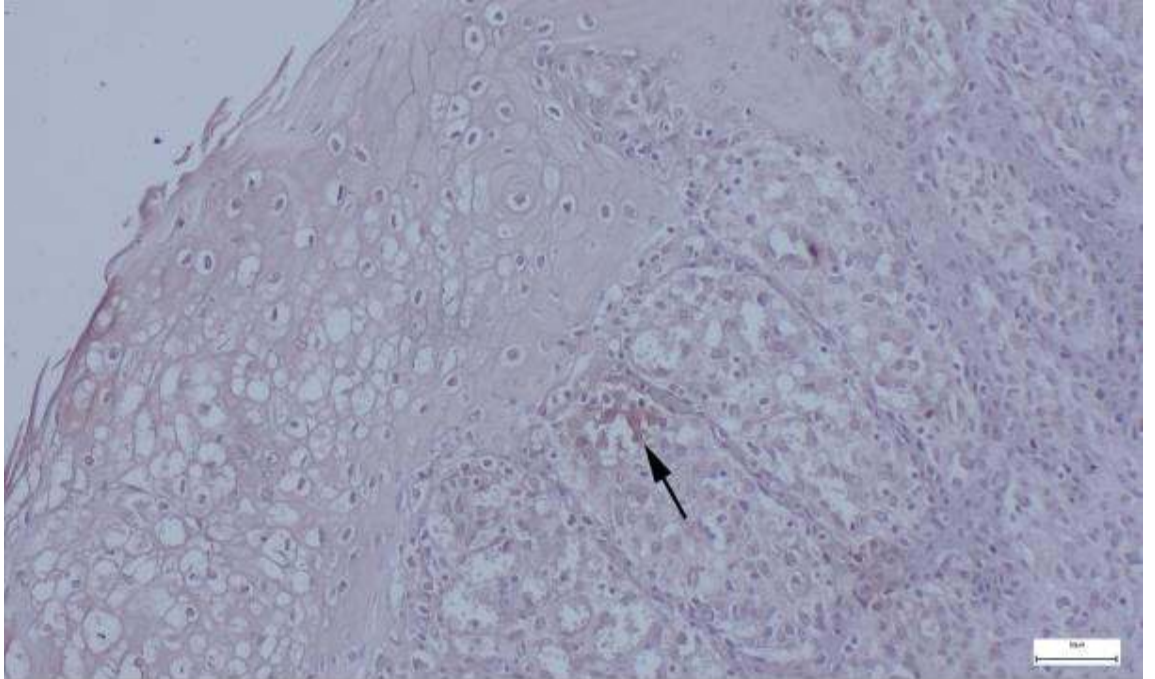
Ektimalı bölgelerin HSP-70 immunohistokimyasal olarak boyanan kesitlerde özellikle mezankimal hücrelerde ve yangısal hücrelerde hafif şiddette ekspresyonlar gözlemlendi. Genel olarak hafif şiddette olan ekspresyonlara bazı olgularda epitel hücrelerin de rastlandı (Şekil 3.15- 3.19).



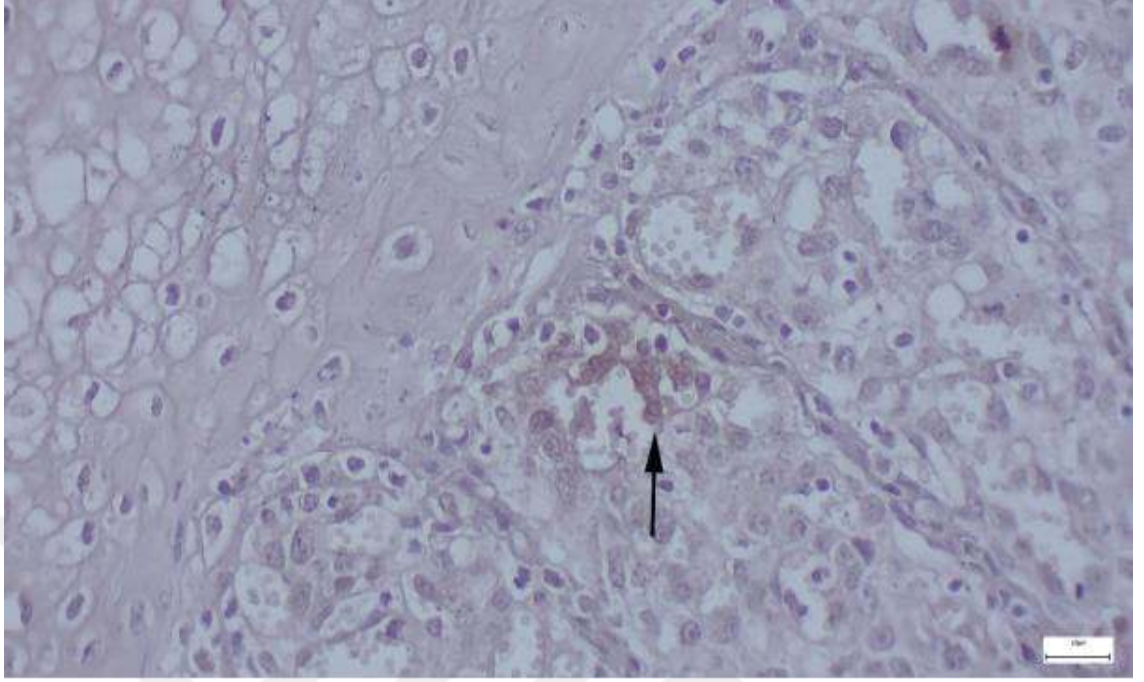
Şekil 3.15. Ektimalı bir oğlakta mezenkimal hücrelerde hafif şiddette HSP-70 ekspresyonları (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 50µm.



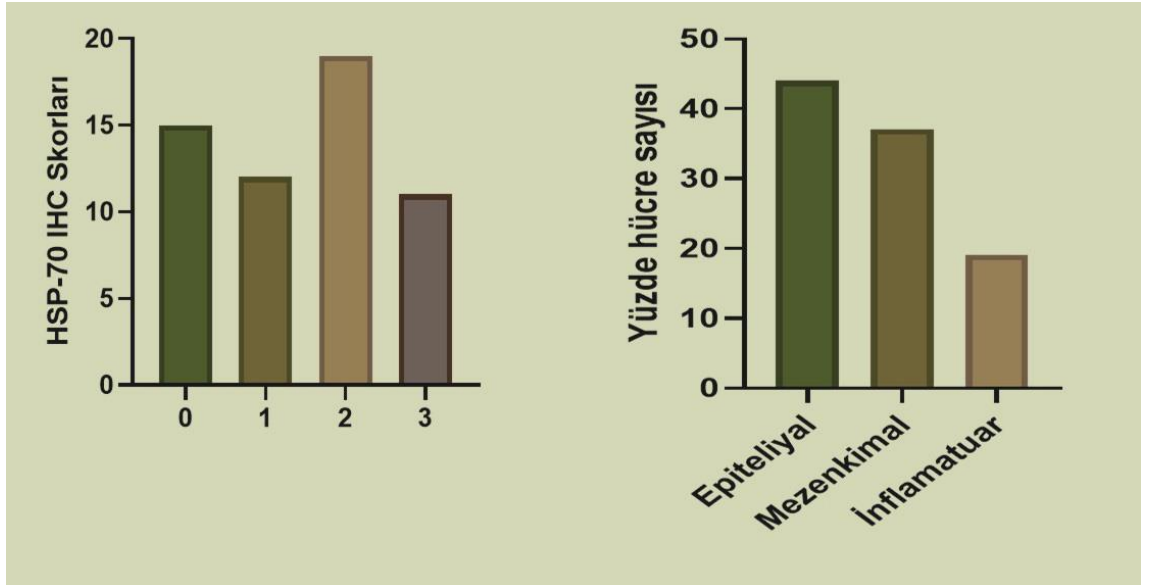
Şekil 3.16. Bir başka ektima lezyonunda yangısal hücrelerde hafif şiddette HSP-70 ekspresyonları (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 50µm.



Şekil 3.17. Ekima lezyonunda bir alandaki yangısal hücrelerde hafif şiddette HSP-70 ekspresyonları (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 50µm.



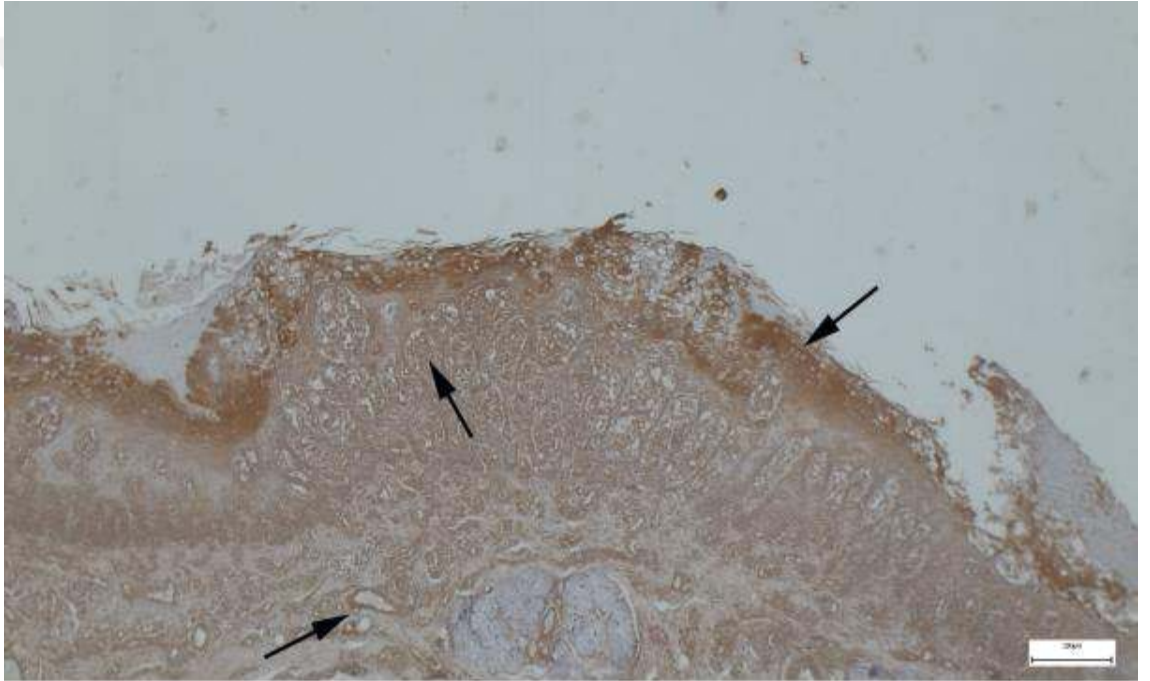
Şekil 3.18. Yukarıdaki resmin yakından görünümü, yangı hücrelerinde ekspresyonlar (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 20µm.



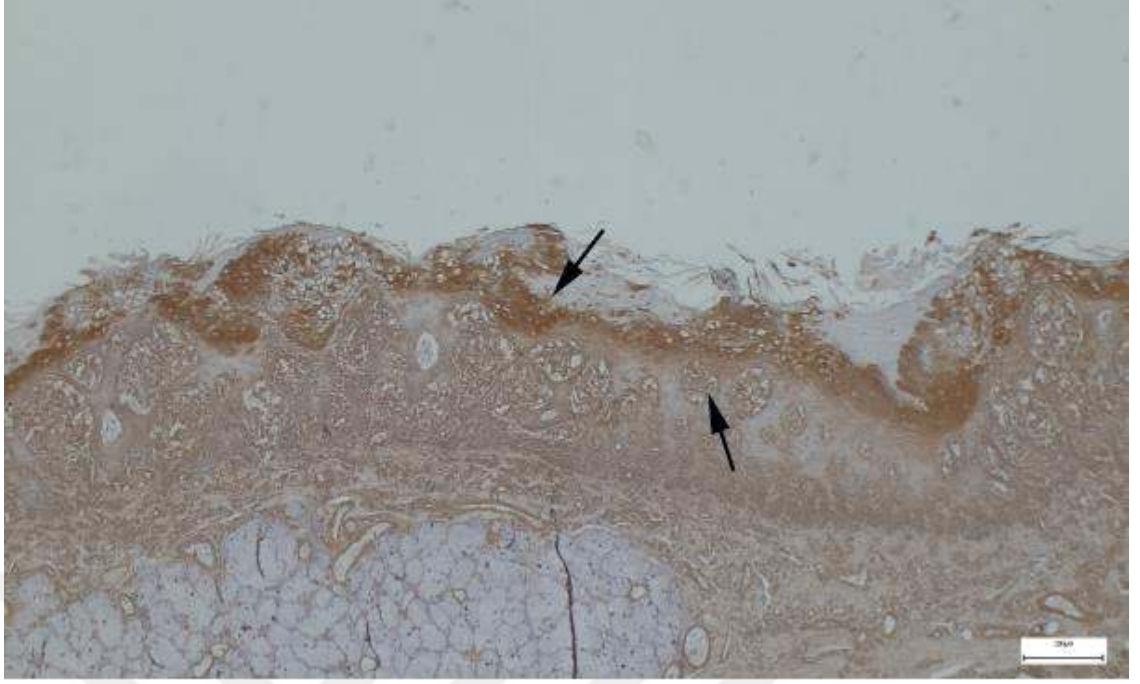
Şekil 3.19. Lezyonlu alanlarda HSP-70 ekspresyon skorları ve eksprese eden hücre yüzdesi

3.3.2.TLR-4 İmmunohistokimyasal Bulguları

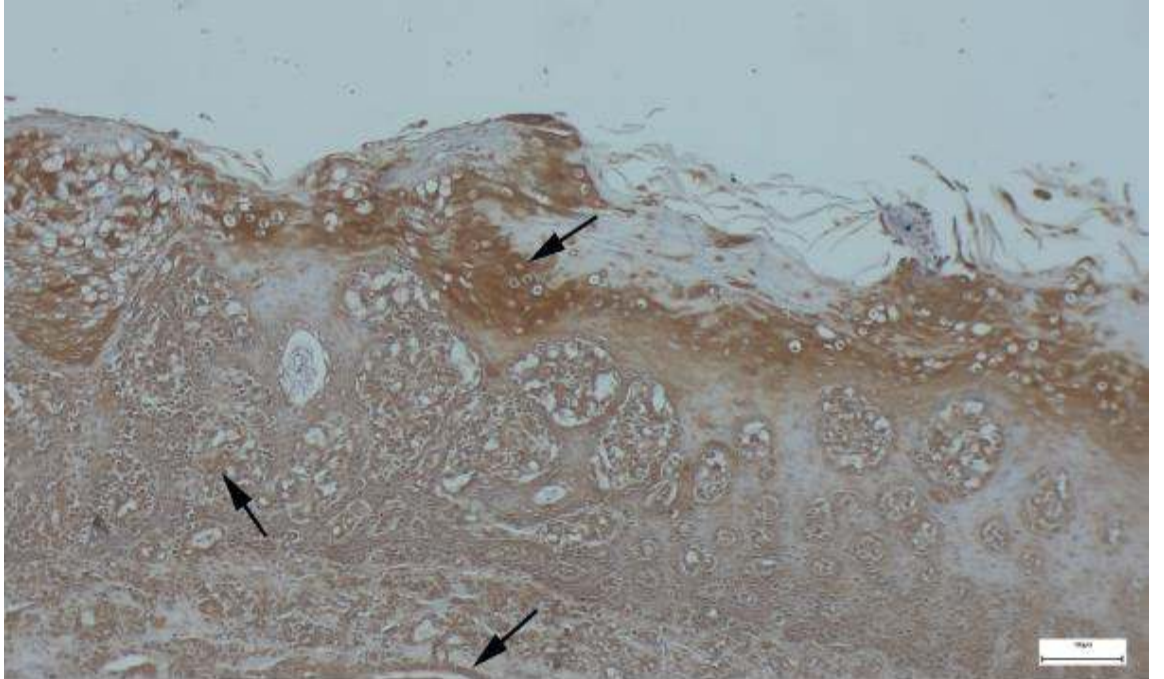
İmmunohistokimyasal olarak TLR-4 ile boyanan kesitlerde epitel hücrelerinde, mezenkimal hücrelerde ve yangısal hücrelerde belirgin ekspresyonlar gözlendi. Pozitif reaksiyona özellikle ortokeratotik epitel hücrelerinde, yangısal hücrelerde, bes epitel ve kanal hücrelerinde ve mezenkimal hücrelerde belirgin şekilde rastlandı (Şekil 3.20-3.25).



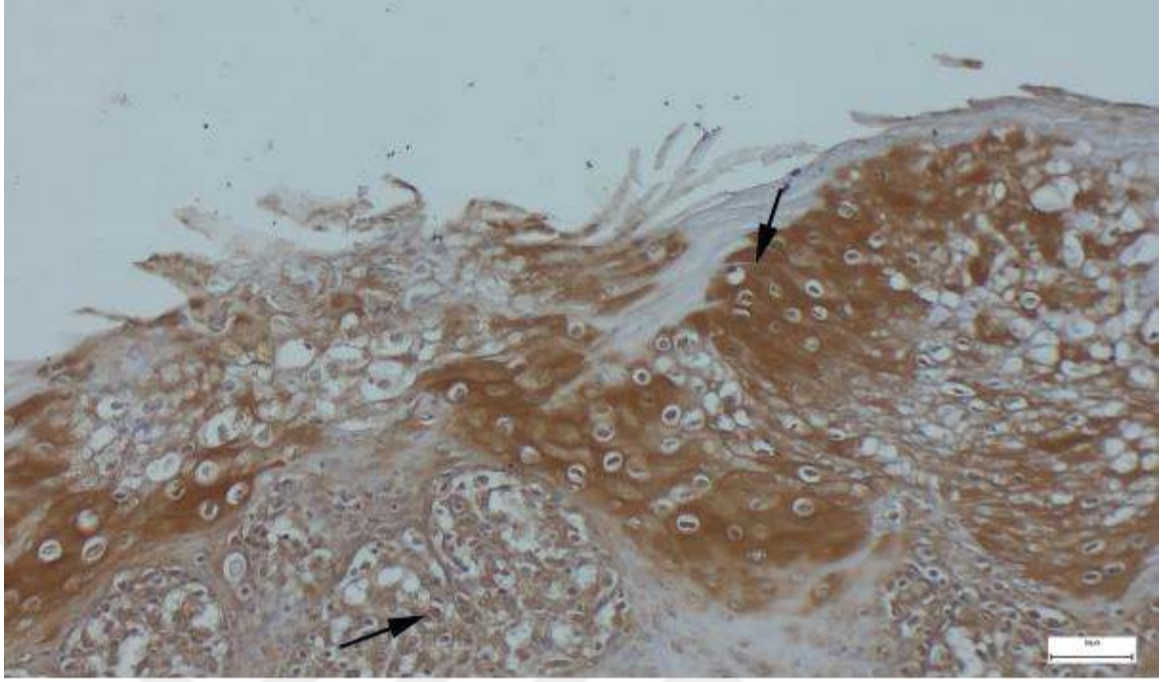
Şekil 3.20. Lezyonlu bölgede TLR-4 ekspresyonlarının görünümü, epitel ve mezenkimal hücrelerde belirgin pozitif reaksiyon (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 200µm.



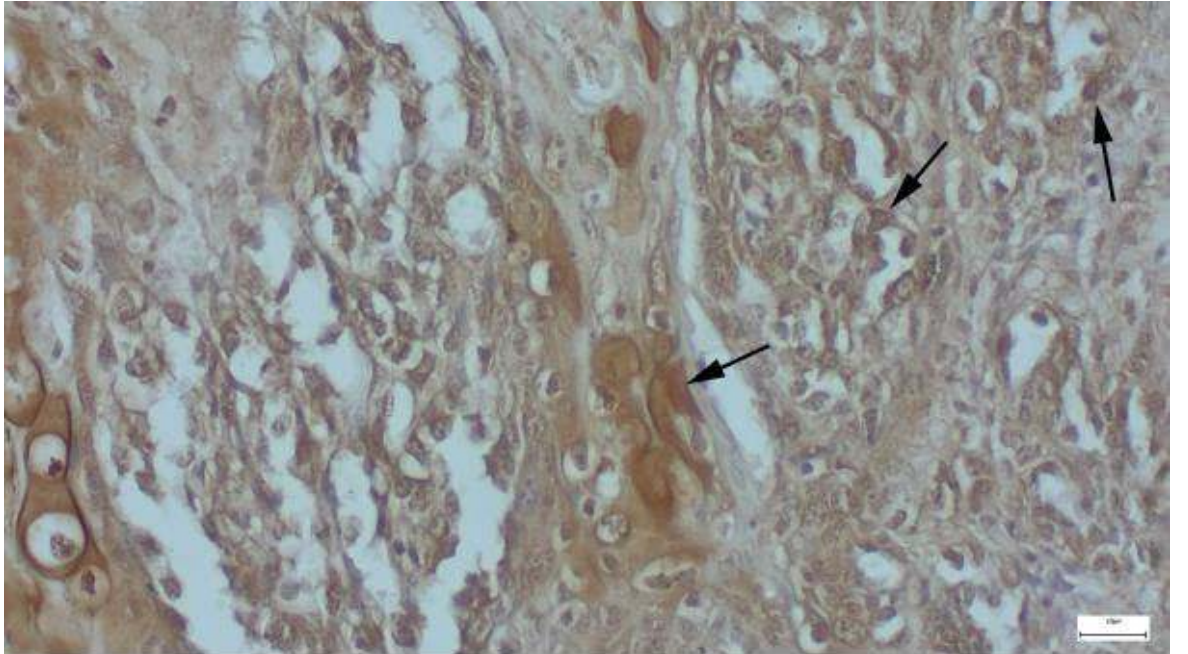
Şekil 3.21. Bir başka lezyonlu bölgede TLR-4 ekspresyonlarının görünümü, epitel ve mezenkimal hücrelerde belirgin pozitif reaksiyon (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 200µm.



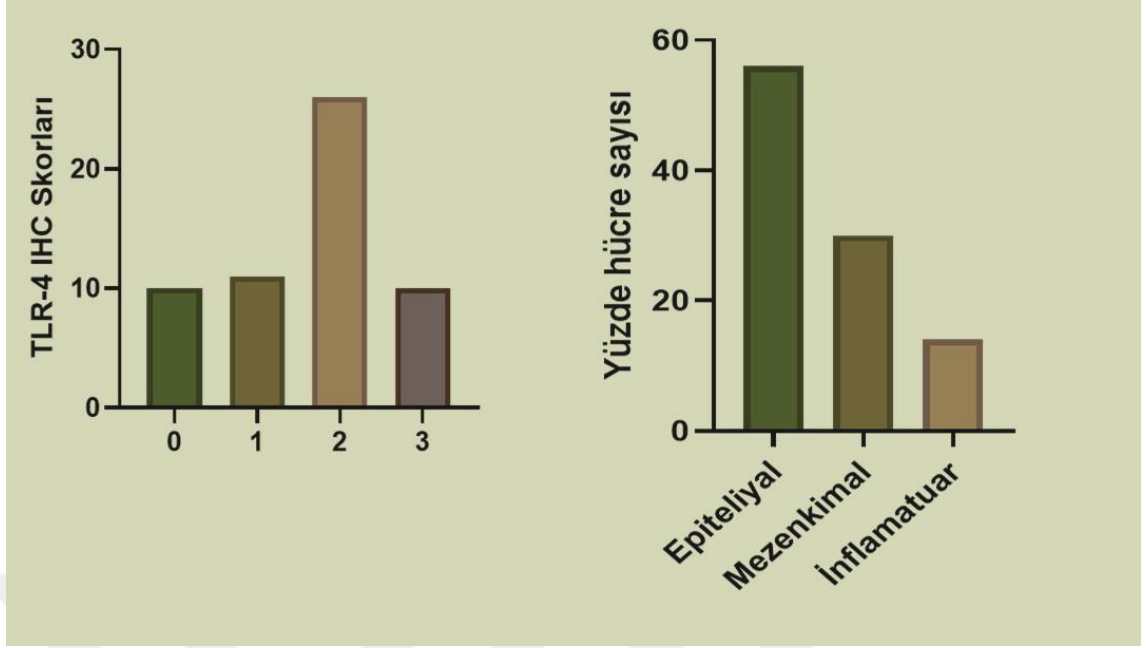
Şekil 3.22. Yukarıdaki resmin yakından görünümü epitel ve mezenkimal hücrelerde pozitif immuno reaksiyon (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 100µm.



Şekil 3.23. Ortokeratotik hücreler ile yangısal hücrelerde belirgin ekspresyonlar (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 50µm.



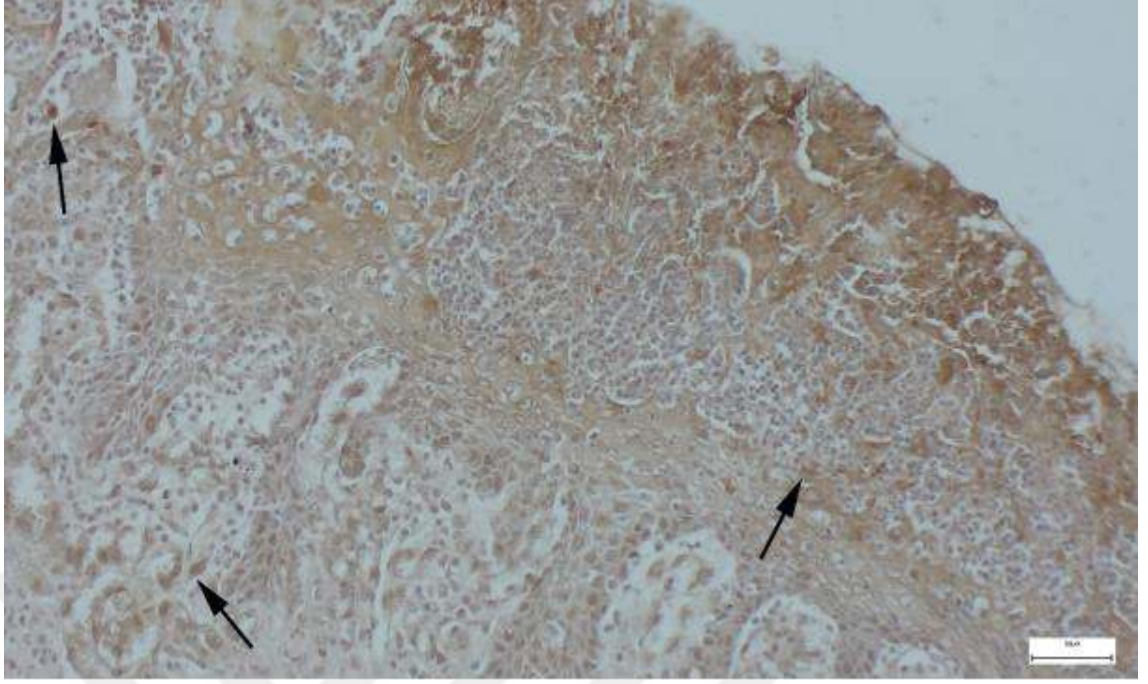
Şekil 3.24. Immunopozitif hücrelerin (oklar) büyütülmüş görünümü, Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 20µm.



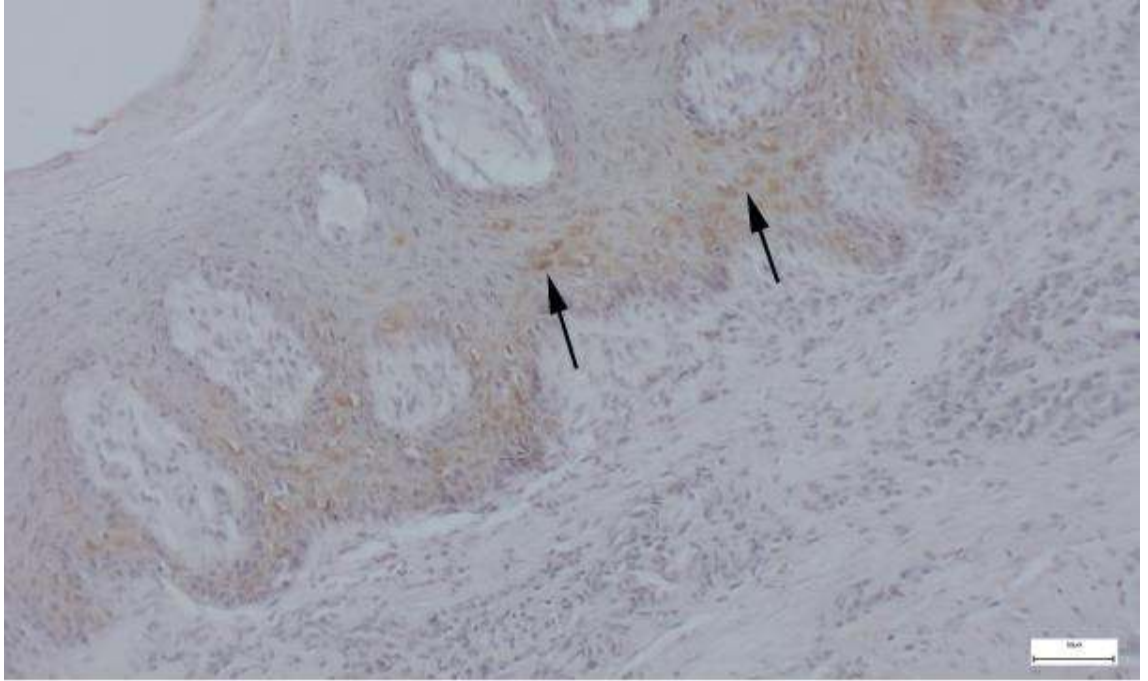
Şekil 3.25. Lezyonlu alanlarda TLR-4 ekspresyon skorları-ı ve eksprese eden hücre yüzdesi

3.3.3. Kaspaz 3 Immunohistokimyasal Bulguları

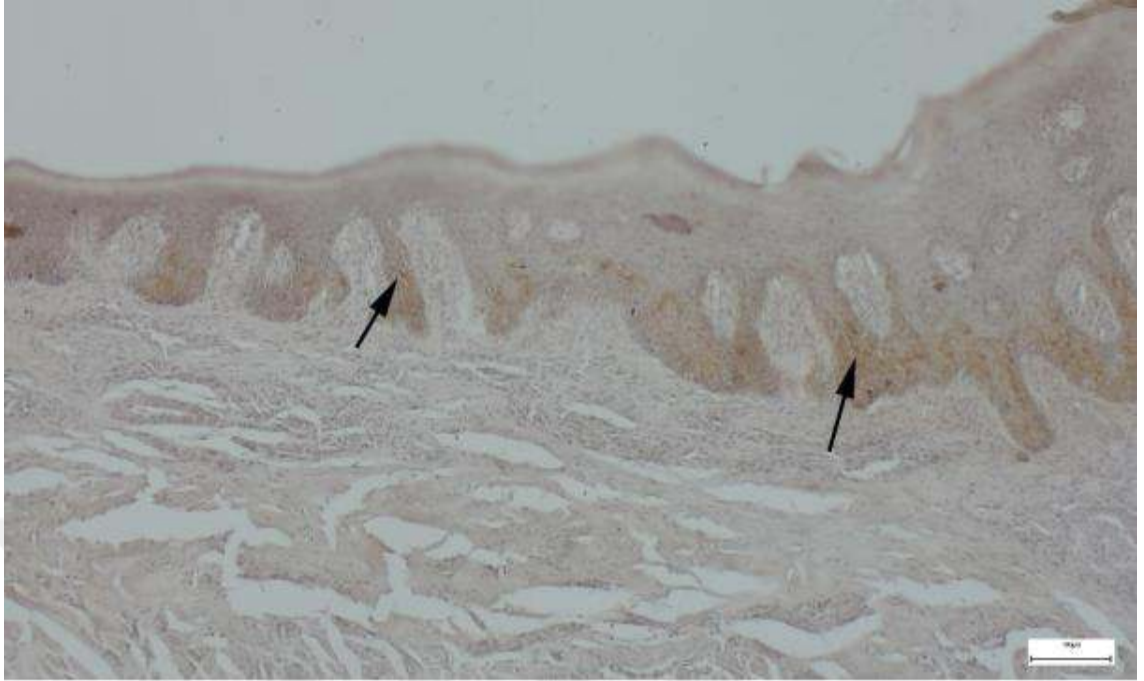
Kaspaz-3 immunohistokimyasal bulguları değerlendirildiğinde lezyonlu bölgelerdeki epitel hücrelerinde ve yangısal hücrelerde belirgin ekspresyonlara rastlandı. Epidermiste özellikle bazal ve spinozum hücrelerinde ekspresyonlar gözlemlendi (Şekil 3.26- 3.33).



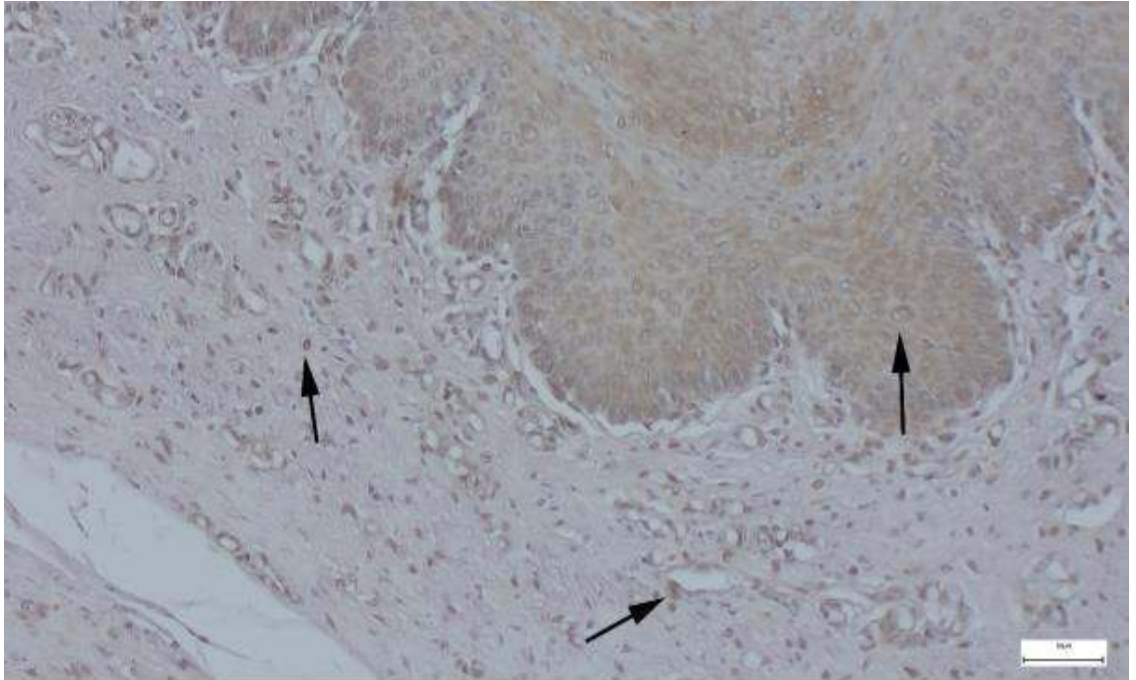
Şekil 3.26. Lezyonlu bölgede epitelial ve mezenkimal hücrelerde belirgin ekspresyonlar (oklar) Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 200μm.



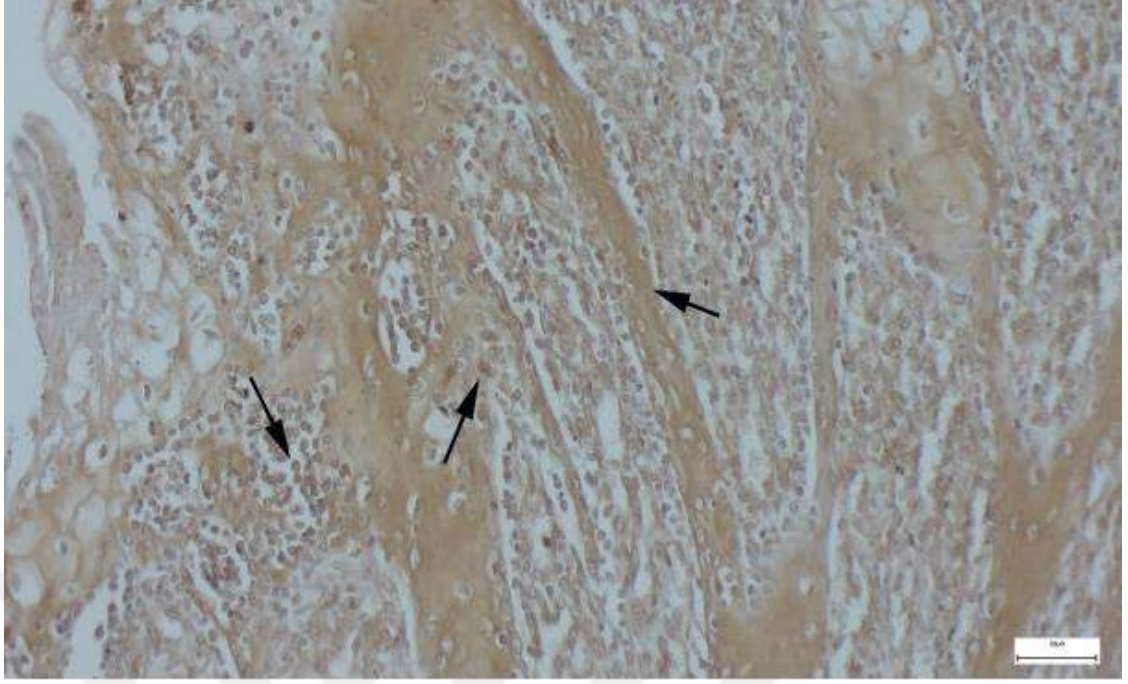
Şekil 3.27. Lezyonlu bölgede epidermin bazal ve spinozum tabakalarındaki hücrelerinde belirgin ekspresyonlar (oklar) Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 200μm.



Şekil 3.28. Bir başka alanda epidermin bazal ve spinozum tabakalarındaki hücrelerde belirgin ekspresyonlar (oklar) Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 200µm.



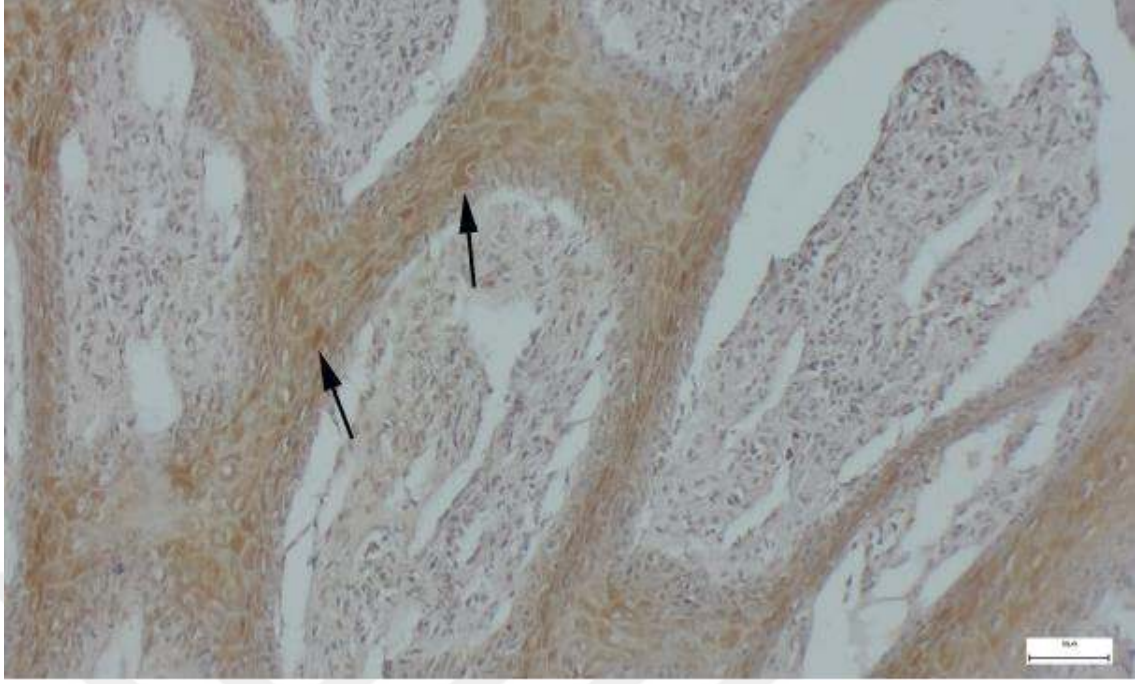
Şekil 3.29. Bir başka olguda epitel ve mezenkimal hücrelerde pozitif immunoekspresyonlar (oklar) Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 50µm.



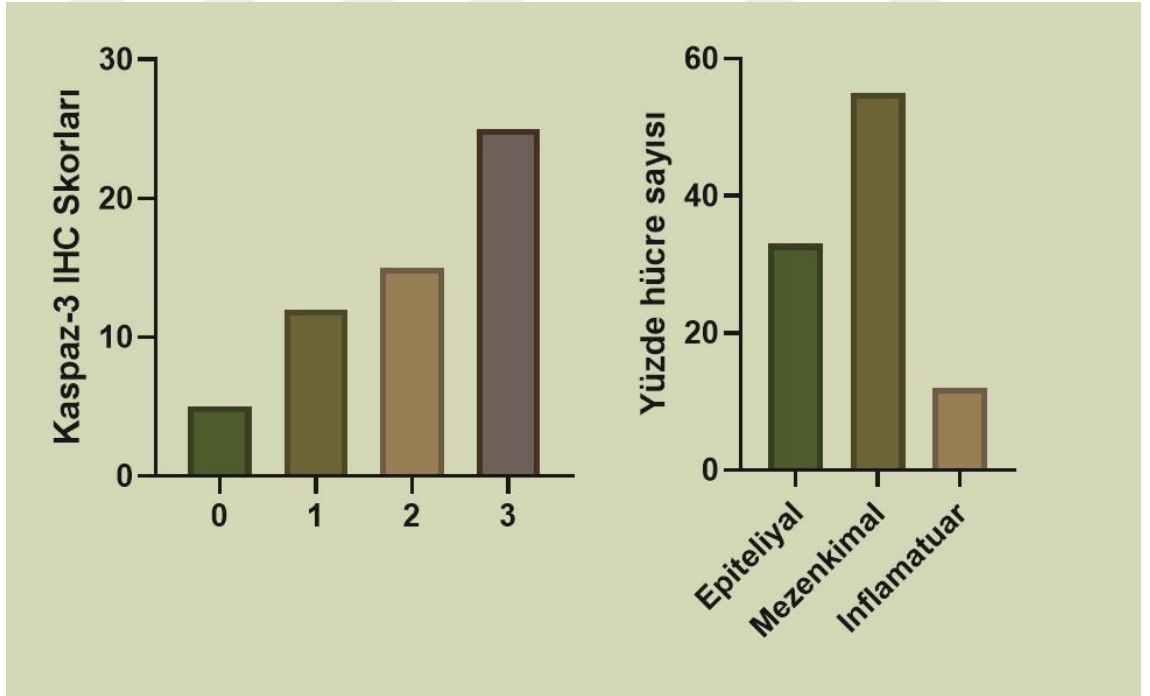
Şekil 3.30. Epiteliyal ve mezenkimal hücrelerde belirgin ekspresyonlar (oklar) Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 50µm.



Şekil 3.31. Epidermin spinozum hücrelerinde belirgin ekspresyonlar (oklar) Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 200µm.



Şekil 3.32. Yukarıdaki alanın büyütülmüş görünümü ve stratum spinosum tabakasındaki hücrelerde belirgin ekspresyonlar (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar= 200μm.



Şekil 3.33. Lezyonlu alanlarda kaspaz-3 ekspresyon skorları ve eksprese eden hücre yüzdesi

4. TARTIŞMA

Bulaşıcı ektima, koyun, keçi ve yabani küçük ruminantlarda görülen bulaşıcı ve viral bir hastalıktır. Özellikle yavruları etkileyen mortalitesi yüksek olan bir enfeksiyondur. Ağız çevresi, dil, dudak ve burun deliği çevresinde sert kabuklu yaralar ile karakterizedir. Hastalıkta görülen en önemli problem ağızda oluşan yaralar sebebiyle hastaların süt emerken, otlarken veya ağılda yem tüketirken hissettikleri ağrı nedeniyle yeterince beslenememeleridir. Bu nedenle hem ekonomik hem de verim kaybına yol açan bir hastalıktır. Ektima hastalığı temasla bulaşması, hızlı yayılımı ve sekonder enfeksiyonlara yol açması nedeniyle önemlidir. Bulaşıcı ektima dünya çapında küçükbaş hayvanlar arasında yaygın olarak seyretmektedir. Hastalık yaz sonu, sonbahar ve kış aylarında daha fazla görülmektedir. Kuzu ve oğlaklar hastalığa yetişkin hayvanlara göre daha duyarlıdır. Ektima hasar görmüş deri yoluyla vücuda girmekte ve epidermal hücrelerde çoğalmaktadır. Hastalık genellikle önemli bir mortaliteye sahiptir. Ektima genç yaştaki hayvanları daha çok etkilemektedir. Ektima genç hayvanların dışında ergin koyun ve keçilerde çeşitli lezyonlarla karakterize enfeksiyonlar şeklinde görülmektedir. Kabukların dökülmesi ile etrafa saçılan virus aylarca hatta yıllarca canlılığını korumaktadır. Konakçı bağışıklığı hastalığın şiddetini sınırlayan ana faktördür. Belirli düzeydeki immun yanıtı rağmen konakçı tekrar tekrar enfekte olabilmektedir. Ektima koyun ve keçilerde makulopapüler, vesiküler, püstüler ve proliferatif lezyonlar oluşturarak dudakları ve dudak-burun arasındaki muko-kutanöz bölgeleri etkilemektedir. Enfeksiyona bağlı deride multifokal eritem, papül, vezikül, püstül ve kabuk aşamaları gelişmektedir. Ektima enfeksiyonlarında keçilerde kronik pnömoni, arthritisi, orta-şiddetli lenfadenopati ve multifokal proliferatif dermatitis şekillenebilmektedir. Sistemik enfeksiyonlarda; gastroenteritis, bronkopnömoni ve sindirim sistemi bozuklukları gelişebilmekte ve trakea da etkilenebilmektedir. Hastalık genellikle 3-4 hafta sürer ve 1-2 ayda skar dokusu oluşmadan iyileşme görülmektedir. Hasta hayvanlarda; özellikle gençlerde gıda alımını önemli ölçüde azaltmaktadır. Buna bağlı olarak gençlerde büyüme bozukluğu, kuzu ve oğlaklarda ölümler görülmektedir. Lezyon görülen hayvanların sağlıklı, aşısız hayvanlardan karantina yoluyla ayrılması gerekmektedir. Sürülerin otlatıldığı meralardaki dikenli otların yok edilmesi veya otlatmada tercih edilmemesi ağız bölgesinde oluşabilecek yaraları önleyebilmektedir (Kale ve Atlı, 2017).

Ektima, Parapoxvirus ailesi içinde yer alan Orf virusunun neden olduğu zoonotik ve yaygın bir deri enfeksiyonudur. Çoğunlukla koyun ve keçilerde görülen bu hastalık, özellikle genç hayvanları etkiler ve ağız çevresi, dudaklar, burun ve ayaklarda proliferatif lezyonlar oluşturur (Kale ve Atlı, 2017; Özmen ve Dolu, 2018). Bu çalışmada, ektimalı hayvanların lezyonlu dokularında TLR-4, HSP-70 ve kaspaz-3 ekspresyonunları immunohistokimyasal olarak değerlendirilmiş ve bu belirteçlerin ektima patogeneğinde aktif bir rol oynadığını saptanmıştır.

Bu tez kapsamında yapılan immunohistokimyasal değerlendirmeler sonucunda, TLR-4'ün özellikle epitel ve mezenkimal hücrelerde yüksek düzeyde eksprese edildiği gözlemlenmiştir. TLR-4, ektima virusunun enfekte ettiği dokularda belirgin olarak eksprese edilmekte olup, bu durum doğuştan gelen bağışıklık sisteminin enfeksiyon bölgesinde hızlı bir şekilde aktive olduğunu göstermektedir. Ayrıca, bu aktivasyonun sonucunda inflamatuvar sitokin salınımının tetiklendiği ve makrofaj ile dendritik hücrelerin aktive olduğu anlaşılmıştır. Bu bağlamda, epitel hücreler üzerinde TLR-4 pozitifliği, virusun giriş bölgesindeki savunma hattının bir göstergesidir.

TLR-4'ün, Gram-negatif bakterilerin LPS yapısını tanımasının yanı sıra, viral enfeksiyonlar ve steril inflamasyon gibi çok sayıda patofizyolojik süreçte aktif rol oynadığı bilinmektedir (Akira ve Takeda, 2004; Kawai ve Akira, 2010; Lu ve ark., 2008; Yamamoto ve ark., 2003). MyD88-bağımlı yol hızlı inflamatuvar yanıtların başlatılmasından sorumlu iken, TRIF-bağımlı yol interferon üretimini teşvik eder (Kawai ve Akira, 2010). Bu iki yolun aktivasyonu, sitokin salınımını, makrofaj ve dendritik hücre aktivasyonunu ve enfekte hücrelerin ortadan kaldırılmasını tetikler. Ektima gibi lokalize enfeksiyonlarda, TLR-4'ün özellikle epitel hücreler ve alttaki mezenkimal dokularda eksprese edilmesi, bağışıklık yanıtının lezyon bölgesinde yoğunlaştığını göstermiştir. Elde edilen bulgular bu mekanizmalarla uyumludur. Epitel dokudaki TLR-4 ekspresyonunun yüksekliği, literatürde tanımlanan dokuya özgü bağışıklık savunmasının bir yansıması olarak değerlendirilebilir. Aynı zamanda, bu ekspresyonun yalnızca enfekte dokularla sınırlı kalmayıp mezenkimal dokularda da saptanması, ektima virusunun yayılımına karşı daha geniş bir immun savunma yanıtı geliştirildiğini düşündürmektedir. Çalışmada gözlemlenen TLR-4 pozitifliğinin inflamatuvar hücrelerin yoğun olarak bulunduğu alanlarda daha fazla olması da dikkat

çekmektedir. Bu durum, TLR-4'ün yalnızca doğrudan enfekte hücrelerde değil, aynı zamanda bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunda da rol oynadığını göstermektedir. Keratinositler ve dendritik hücreler, TLR-4 aracılığıyla patojen tanıma ve sitokin üretiminde aktif rol oynayarak TLR-4 sinyali, NF- κ B gibi transkripsiyon faktörlerini aktive ederek proinflamatuvar genlerin ekspresyonunu başlatır (Kawai ve Akira, 2010).

Yapılan araştırmalar, TLR-4 ekspresyonunun kronik inflamatuvar hastalıklarda ve bazı viral enfeksiyonlarda artış gösterdiğini bildirmiştir (Beutler, 2000a; Beutler, 2000b). Bu çalışma ise TLR-4'ün ektima enfeksiyonunda aktivasyon profiline dair literatüre katkı sağlamaktadır. TLR-4'ün özellikle enfeksiyonun aktif evresinde yoğun eksprese edilmesi, bu molekülün potansiyel bir tanı ve prognoz belirteci olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. TLR-4'ün ektima patogenezinde hem doğuştan gelen bağışıklığın aktive edilmesinde hem de enfekte hücrelerin ortadan kaldırılmasında çok yönlü bir rol oynadığını ortaya koymaktadır. Bu durum, güncel literatürle uyumlu olup, TLR-4'ün ektima enfeksiyon patofizyolojisindeki kritik konumunu göstermektedir.

TLR-4'ün ektima hastalığında lezyonlu bölgelerde yüksek düzeyde eksprese edilmesi, bu reseptörün doğuştan gelen bağışıklık sisteminde merkezi bir rol oynadığını düşündürmektedir. TLR-4'ün epitel ve bağ dokusu hücrelerinde saptanması, patojenlerin tanınmasında ve bağışıklık sisteminin yönlendirilmesinde önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Bu çalışma, ayrıca TLR-4'ün hem tanısal hem de potansiyel terapötik bir hedef olarak ele alınabileceğini göstermektedir. İleriye dönük olarak, TLR-4 ile ilişkili gen ekspresyon analizleri ve fonksiyonel çalışmalar, ektima ve benzeri enfeksiyonların immunolojik açıdan daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. Bu çalışmanın sonuçları veteriner pratikte, TLR-4 gibi moleküllerin immunohistokimyasal düzeyde belirlenmesinin enfeksiyonun şiddeti hakkında bilgi verebileceğini göstermiştir. Bu sonuçlara göre, TLR-4'ü hedef alan terapötik stratejiler, özellikle şiddetli inflamasyon durumlarında ektima gibi hastalıklarda yararlı olabileceği düşünülmektedir. Örneğin, TLR-4 antagonisti moleküllerin, aşırı inflamasyon ve enfeksiyonun baskılanmasında kullanılabileceğini düşündürmüştür. Bu bağlamda, ektima gibi zoonotik hastalıklarda TLR-4 düzeylerinin belirlenmesi hem koruyucu hekimlik hem de tedavi protokolleri açısından önemli olabileceği düşünülmektedir.

TLR-4'ün HSP-70 ile ortaklaşa hareket ederek inflamatuvar sinyal yollarını aktive edebileceği yönündeki literatür bilgileri (Multhoff, 2007), bu çalışmada TLR-4 ve HSP-70'in birlikte değerlendirildiği bulgularla örtüşmektedir. Aynı zamanda kaspaz-3 ekspresyonunun da belirgin olması, TLR-4'ün yalnızca savunma mekanizmalarını değil, apoptozis gibi hücre içi yıkım süreçlerini de tetiklediğine işaret etmektedir.

Ektima genellikle zayıflamış bağışıklık sistemi, kötü hijyen koşulları ve travmatik deri hasarları zemininde ortaya çıkar. HSP'ler hücrel stres durumlarında sentezlenen koruyucu proteinlerdir. Bu proteinler, hücre içi proteinlerin katlanmasını kolaylaştırmakta, denatüre olmuş proteinleri stabilize etmekte ve hücreyi apoptotik yıkımdan korumaktadır (Hartl ve ark., 2011). HSP ailesinin en iyi tanımlanmış üyelerinden biri olan HSP-70, hem konak hücre savunmasında hem de bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde önemli roller üstlenmektedir. Viral enfeksiyonlar sırasında HSP-70 düzeyleri genellikle artış göstermektedir; bu durum, virusun neden olduğu hücrel hasarın bir sonucu olarak yorumlanmıştır. Bu enfeksiyon sürecinde konak hücreler yoğun oksidatif stres, inflamatuvar sinyalizasyon ve apoptozis gibi hücrel yanıtlarla karşı karşıya kalır. HSP-70 bu süreçlerde kritik roller üstlenerek enfeksiyona karşı konak savunmasını düzenler (Beere ve ark., 2000; Binder, 2004; Evans ve ark., 2010; Kampinga ve Craig, 2010; Kiang ve Tsokos, 1998).

HSP-70, hücrel homeostazın korunmasında görev yapan bir moleküler şaperon olup, protein katlanması, agregatların çözülmesi ve proteazom yoluyla yıkımı gibi mekanizmaları düzenler (Kampinga ve Craig, 2010; Kiang ve Tsokos, 1998; Mayer ve Bukau, 2005). Ektima enfeksiyonu sırasında gözlemlenen artmış HSP-70 ekspresyonu, bu proteinlerin enfeksiyon kaynaklı hücre stresine karşı hücre içi savunmayı desteklediğini ortaya koymaktadır.

Ayrıca, HSP-70'nin apoptozisin düzenlenmesinde ve inflamatuvar sinyalleşmenin modülasyonunda da etkili olduğu bilinmektedir. NF- κ B yolağını inhibe ederek aşırı inflamatuvar yanıtı baskılaması, ektima enfeksiyonlarında doku hasarını azaltıcı bir etki yaratabilir (Asea, 2003; Beere ve ark., 2000). Bu çalışma da HSP-70'nin yalnızca strese yanıt vermekle kalmayıp, aynı zamanda immun cevabın düzenlenmesinde de aktif rol üstlendiğini göstermektedir.

HSP-70'nin DAMP özelliği göstererek bağışıklık hücrelerini aktive edebildiği gösterilmiştir (Binder, 2004). Bu bağlamda, tezde elde edilen bulgular HSP-70'nin hem hücre içi koruyucu şaperon görevi gördüğünü hem de bağışıklık sistemi üzerinden enfeksiyon yanıtını şekillendirdiğini göstermektedir.

Bu çalışmada, ektima hastalığına sahip koyun ve keçilerden alınan lezyon örneklerinde HSP-70 ekspresyonu immunohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Bulgulara göre, HSP-70 özellikle mezenkimal hücrelerde ve yangısal hücre infiltrasyonlarının olduğu bölgelerde belirgin şekilde eksprese edilmiştir. Epitel hücrelerde ise ekspresyon daha sınırlı düzeyde gözlenmiştir. Bu durum, HSP-70'in enfeksiyon alanındaki hücresel stres yanıtının önemli bir göstergesi olduğunu ve virusa bağlı inflamatuvar süreçlerle ilişkilendirilebileceğini göstermektedir.

HSP-70 yalnızca hücresel düzeyde proteostazı korumakla kalmaz, aynı zamanda immun yanıtın düzenlenmesinde de rol oynar. Bu protein, dendritik hücrelerin aktivasyonunu ve sitokin üretimini uyarır. Ayrıca, bazı çalışmalarda HSP-70'in Toll-benzeri reseptörlerle (özellikle TLR-2 ve TLR-4) etkileşime girerek inflamatuvar yanıtları artırabildiği bildirilmiştir (Multhoff, 2007). Dolayısıyla, ektima enfeksiyonlarında gözlenen HSP-70 artışı, yalnızca pasif bir stres yanıtı değil, aynı zamanda aktif bir immun modülasyon aracı olarak da değerlendirilebilir.

Tez kapsamında elde edilen immunohistokimyasal veriler, HSP-70'in özellikle epitel ve yangısal hücrelerde belirgin düzeyde eksprese edildiğini ortaya koymuştur. HSP-70, enfekte dokularda stres yanıtı proteinlerinden biri olarak artış göstermiştir. Bu durum, ektima enfeksiyonu sırasında hücrelerin maruz kaldığı çevresel ve enfeksiyöz streslere karşı koruyucu bir mekanizma olarak yorumlanabilir.

Özellikle epitel hücrelerde gözlenen yoğun HSP-70 pozitifliği, bu hücrelerin enfeksiyon süresince termal, oksidatif ve immunolojik strese maruz kaldığını ve hayatta kalmak için HSP-70 üzerinden bir yanıt geliştirdiğini göstermektedir. Ayrıca yangısal hücrelerdeki artış, bağışıklık sisteminin enfeksiyon bölgesindeki aktivasyonu ile ilişkilendirilebilir. Araştırmamızda saptanan pozitif boyanma, enfeksiyona maruz kalan hücrelerin HSP-70 üretimini artırarak hayatta kalma ve doku bütünlüğünü koruma

abasinda olduğunu ortaya koymaktadır. Bu durum, virusun doğrudan sitopatik etkilerine karşı hüresel savunma mekanizmalarının devreye girdiğini düşündürmektedir. Mezenkimal hücrelerdeki yoğun boyanma, bu hücrelerin enfeksiyona karşı daha aktif bir stres yanıtı sergilediğini göstermektedir.

HSP-70'in terapötik potansiyeli de göz önünde bulundurulmalıdır. Viral enfeksiyonlarda bu protein hedef alınarak apoptozisin düzenlenmesi veya inflamasyonun modüle edilmesi mümkündür. HSP-70 inhibitörleri, bazı alışmalarda kanser ve enfeksiyon hastalıkları için potansiyel ajanlar olarak değerlendirilmiştir (Kampinga ve Craig, 2010; Kiang ve Tsokos, 1998). Bununla birlikte, HSP düzeylerinin aşırı baskılanması hüresel dengeyi bozabileceği için dikkatli yaklaşım gerektirir.

Bu alışmadan elde ettiğimiz ve ektima hastalığında HSP-70'in rolünü açıklayan bulgular, protein düzeyinin immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesinin tanı, prognoz ve olası tedavi yönlendirmelerinde kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak bu gözlemlerin kantitatif düzeyde desteklenmesi ve farklı hastalık evrelerinde karşılaştırmalı analizlerin yapılması önem arz etmektedir. Sonuç olarak, HSP-70, ektima hastalığının seyrinde hem hüresel stresin göstergesi hem de bağışıklık yanıtının bir parçası olarak işlev görmektedir. Bu alışmada gösterilen pozitif ekspresyon, enfekte dokuların biyolojik tepkilerinin bir parçası olup, gelecekteki alışmalarda moleküler hedef olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır. Bulgularımız, ektima hastalığı patogenezinde HSP-70'nin çok yönlü bir rol oynadığı hem hüresel stresle mücadelede hem de immun yanıtın regülasyonunda görev aldığını göstermiş olup bulgularımız HSPlerin diğer hastalıklardaki literatür verileriyle güçlü biçimde desteklenmektedir.

Ektima hastalığı, derin ülseratif lezyonlara yol açan ve genellikle streptokok veya stafilokok gibi bakterilerinin sekonder olarak karıştığı bir deri enfeksiyonudur. Bu patolojik süreç, enfekte hücrelerin kontrollü şekilde elimine edilmesini sağlayan apoptozis mekanizmalarını tetikleyebilir. Bu bağlamda, kaspaz-3 apoptoziste önemli bir bileşen olarak ektima lezyonlarının düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar. Kaspaz-3, programlanmış hücre ölümü yani apoptozisin yürütücü enzimlerinden biridir. Bu proteaz, çeşitli uyarılarla aktive edilen apoptozis yolaklarında DNA paralanması, hücre iskeletinin yıkımı ve hüresel içeriklerin kontrollü şekilde ortadan kaldırılması

süreçlerinde kritik bir rol oynar (Porter ve Jänicke, 1999). Apoptozis, fizyolojik ve patolojik durumlarda hücre sel bütünlüğün korunmasında etkili bir mekanizma olup, enfeksiyonlara karşı gelişen bağışıklık yanıtının önemli bir parçasıdır.

Virusla enfekte olmuş hücrelerin kontrollü bir şekilde elimine edilmesi, çevre dokulara zarar verilmeden enfeksiyonun sınırlanmasını sağlar. Kaspaz-3'ün bu süreçte aktif olması, ektima virusunun immun sistem tarafından kontrol altına alınmasında apoptozun etkin bir savunma mekanizması olduğunu ortaya koymaktadır. Literatürde, viral enfeksiyonların çoğunda kaspaz yolaklarının aktive olduğu ve enfekte hücrelerin apoptozis yoluyla ortadan kaldırıldığı bildirilmektedir (Elmore, 2007; Riedl ve Shi, 2004).

Bu çalışmada kaspaz-3'ün epitel hücrelerle birlikte mezenkimal hücrelerde de pozitif saptanması, virusun yalnızca epitel dokuda sınırlı kalmayıp bağ dokulara da etkide bulunduğunu düşündürmektedir. Ayrıca yangısal hücrelerde gözlenen ekspresyon, immun hücrelerin enfeksiyona verdikleri yanıt sırasında apoptozise uğradıklarını ya da immun yanıtın kontrolünde bu mekanizmanın aktifleştğini düşündürmektedir.

Literatürde kaspaz-3'ün enfeksiyonla ilişkili hücre stresi sonucunda aktive olduğunu ve konak savunması açısından enfekte hücrelerin seçici yıkımını sağladığı bildirilmektedir (Kumar, 2007). Tezdeki pozitif bulgular bu görüşle örtüşmekte olup, ektima patogenezinde kaspaz-3'ün önemli bir immun kontrol mekanizması olduğunu ortaya koymaktadır. Tez kapsamında yapılan immunohistokimyasal analizler, kaspaz-3'ün ektima lezyonlarında özellikle epitel ve yangısal hücrelerde yoğun olarak eksprese edildiğini ortaya koymuştur. Bulgular, enfekte hücrelerin eliminasyonunda apoptozisin aktif olarak devreye girdiğini ve bu sürecin kaspaz-3 aracılığıyla yönetildiğini göstermiştir.

Epitel hücrelerinde gözlemlenen pozitif kaspaz-3 sinyali, virusun giriş ve replikasyon bölgesinde enfekte hücrelerin kontrollü yıkımına işaret etmektedir. Aynı şekilde yangısal hücrelerde de tespit edilen ekspresyon, inflamasyonun regülasyonu açısından apoptotik mekanizmaların aktif rol oynadığını düşündürmektedir.

Kaspaz-3, hem ekstrinsik (ölüm reseptörü aracılı) hem de intrinsik (mitokondriyal) apoptozis yollarının ortak son aşamasında yer alır ve substrat proteinlerin parçalanmasını sağlayarak hücrel ölüm sürecini tamamlar (Porter ve Jänicke, 1999; Elmore, 2007). Tez bulgularında saptanan Kaspaz-3 aktivitesi, bu apoptotik sürecin ektima enfeksiyonu sırasında aktifleştğini doğrular niteliktedir.

Kaspaz-3'ün sadece hücre ölümü ile değil, yara iyileşmesi ve rejeneratif süreçlerle de ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Ayrıca düşük düzeyde kaspaz-3 aktivitesi, dokuda proliferatif yanıtları tetikleyerek reepitelizasyonu destekleyebilir (Li ve ark., 2010). Bu açıdan tez bulguları, kaspaz-3'ün hem hücre temizliği hem de doku onarımı süreçlerinde ikili rol oynadığını desteklemektedir.

Bu çalışmada, ektima lezyonlarında kaspaz-3 ekspresyonunun immunohistokimyasal olarak yüksek olduğu saptanmıştır. Özellikle epitelin bazal tabakasındaki hücrelerde ve yangısal infiltrasyon alanlarında yoğun pozitiflik izlenmiştir. Bu bulgular, enfeksiyonun neden olduğu hücrel stres ve bağışıklık yanıtına bağlı olarak apoptozis sürecinin aktif hale geldiğini göstermektedir. Çalışmamızın sonuçları, kaspaz-3'ün ektima hastalığında sadece apoptozis değil, aynı zamanda inflamasyon modülasyonu ve doku yenilenmesine katkı sağlayan çok işlevli bir rol üstlendiği hem histolojik bulgular hem de güncel bilimsel verilerle desteklenmiştir.

Apoptozisin hastalık kontrolündeki rolü çift yönlü olabilir. Bir yandan enfekte hücrelerin ortadan kaldırılmasıyla hastalığın yayılımı sınırlandırılırken, diğer yandan aşırı apoptozis doku hasarını artırabilir (Elmore, 2007; Kumar, 2007; Porter ve Jänicke, 1999). Bu nedenle kaspaz-3'ün düzenlenmiş ekspresyonu, hastalığın şiddeti ve seyri üzerinde belirleyici olabilir. Bu bağlamda, ektima lezyonlarında kaspaz-3 aktivitesinin değerlendirilmesi, hastalığın immunolojik dinamikleri hakkında önemli bilgiler sunmaktadır.

Klinik açıdan değerlendirildiğinde, kaspaz-3 gibi apoptozis belirteçlerinin immunohistokimyasal olarak tespiti, enfeksiyonun şiddeti, süresi ve tedaviye yanıtı gibi parametrelerin izlenmesinde kullanılabilir. Ayrıca, apoptozis düzenleyicilerine yönelik

tedavi yaklaşımları da gelecekte ektima benzeri enfeksiyonlarda etkili olabilir. Bu çalışmada kaspaz-3'ün ektima lezyonlarında yüksek düzeyde eksprese edildiği gösterilmiştir. Bu durum, virusla enfekte hücrelerin apoptozis yoluyla ortadan kaldırıldığını ve apoptozisin konak savunmasında aktif rol oynadığını desteklemektedir. Kaspaz-3, hem tanısal hem de terapötik açıdan önem taşıyan potansiyel bir biyobelirteçtir.

Sonuç olarak bu çalışmadan elde edilen bulgular ektima lezyonlarında TLR-4, HSP-70 ve kaspaz-3'ün önemli ölçüde eksprese edildiğini göstermiştir. Bu bulgular her üç belirtecin de ektima patojenezinde rol oynadığı ilk kez saptanmıştır.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada küçük ruminantlarda oldukça bulaşıcı ve önemli ekonomik kayıplara sebep olabilen bir hastalık olan ektimada TLR-4, HSP-70 ve kaspaz-3 ekspresyonları immunohistokimyasal olarak ilk kez incelenmiştir. Çalışmanın bulguları her üç belirtecin de lezyon bölgesinde belirgin şekilde arttığını göstermiştir. Bu veriler ektima patojenezinde TLR-4, HSP-70 ve kaspaz-3'ün önemli rol oynadığını ortaya koymuştur.

Bu viral ve önemli hastalıkta en önemli koruma önlemi aşılama değildir. Ancak bazen aşılama öncesi hastalık şekillenmekte veya aşılamalara rağmen immün sistemi deprese hayvanlarda hastalık şekillenmektedir. Özellikle yavru hayvanlarda ağız ve dudaklarda şekillenen proliferatif ve enfekte lezyonlar sebebiyle önemli yavru kayıpları oluşmakta ve birçok şiddetli vakada tedavi etkisiz kalmaktadır.

Son zamanlarda hem insan hem de hayvan hastalıklarında klasik tedaviye alternatif tedaviler aranmaktadır. Bunlar arasında hastalıklarda artan proteinlerin inhibisyonuna yönelik tedaviler önem çıkmaktadır.

Ayrıca özellikle salgın durumlarında henüz lezyonlar şekillenmeden önce enfekte hayvanların tespiti, teşhis ve tedavi için önemlidir. Tüm bunlar göz önüne alındığında bu çalışmanın sonuçları TLR-4, HSP-70 ve kaspaz-3'ün ektima teşhis ve tedavisinde kullanılabileceğini göstermiştir. Bu konuda preklinik ve klinik çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

Adededeji AJ, Maurice NA, Wungak YS, Adole JA, Chima NC, Woma YT, Shamaki D (2017). Diagnosis of Orf in West African Dwarf Goats In Uyo, Akwa Ibom State, Nigeria. *Afr. J. Infect Dis.*, **11**, 90-94.

Agius JE, Phalen DN, Rose K, Eden JS (2019). New insights into Sauropsid Papillomaviridae evolution and epizootiology: discovery of two novel papillomaviruses in native and invasive Island geckos. *Virus Evol.*, **5** (2), vez051.

Akira, S., Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, **4**(7), 499-511.

Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, **124**(4), 783-801.

Alajlan AM, Alsubeeh NA (2020). Orf (Ecthyma Contagiosum) Transmitted from a Camel to a Human: A Case Report. *Am. J. Case Rep.*, **21**(e927579), 1-3.

Altuğ N, Özdemir R, Cantekin Z (2013). Ruminantlarda Koruyucu Hekimlik: I. Aşı Uygulamaları. *Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **10**(1), 33-44.

Anonim. (2024a). Dollvet: <https://dollvet.com.tr/urunler/orfdoll/> (Erişim Tarihi: 17.05.2024).

Anonim. (2024b). PENORF: <https://vetkontrol.tarimorman.gov.tr/pendik> (Erişim Tarihi: 17.05.2024).

Anonim. (2024c). VETAL: <https://vetal.com.tr/> (Erişim Tarihi: 17.05.2024)

Asea, A. (2003). Initiation of the immune response by extracellular Hsp72: chaperokine activity of Hsp72. *Curr. Immun. Rev.*, **3**(1), 21–29.

Atlı K (2017). Attenüe Parapoxvirus Ovis'in Koyunlarda Bazı Serum Sitokin ve Antikor Seviyelerine Etkisi. (Doktora tezi) Konya/Türkiye: Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü.

Azad MTA, Saha S, Alam MS, Monoura P, Giasuddin M, Islam SMS, Taimur MJFA, Alam J (2016). Epidemiological investigation and phylogenetic analyses of contagious ecthyma virus from goat in Bangladesh. *Asian J. Med. Res.*, **2**, 555.

Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Tailor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR (2000). Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol.* **2(8)**,469-75.

Bergqvist C, Kurban M, Abbas O (2017). Orf virus infection. *Rev. Med. Virol.*, **e1932**, 1-9.

Beutler, B. (2000a). TLR4 as the mammalian endotoxin sensor. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **270**, 109–120.

Beutler, B. (2000b). TLR4: Central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr. Opin. Immunol.*, **12(1)**, 20–26.

Binder, RJ (2004). Heat-shock protein–peptide interactions: a role in antigen presentation. *Semin. Immunol.*, **16(5)**, 405–413.

Cargnelutti JF, Masuda EK, Martins M, Diel DG, Rock DL, Weiblen R, Flores EF (2011). Virological and clinico-pathological features of orf virus infection in experimentally infected rabbits and mice. *Microb. Pathog.*, **50**, 56-62.

Chi X, Zeng X, Hao W, Li M, Li W, Huang X, Luo S (2013). Heterogeneity among Orf Virus Isolates from Goats in Fujian Province, Southern China. *PLoS ONE*, **8(10)**, e66958.

Das A, Wang Y, Babiuk S, Bai J, Dodd K, Jia W (2022). Development of multiplex real-time PCR assays for differential detection of capripoxvirus, parapoxvirus and foot-and-mouth disease virus. *Transbound. Emerg. Dis.*, **69**, 1326–1337.

Elmore, S (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.*, **35(4)**, 495-516.

- El-Tholoth M, Elnaker YF, Shiha G (2015).** Phylogenetic analysis of B2L gene of Egyptian orf virus from naturally infected sheep. *Virus Dis.*, **26(3)**, 147–150.
- Erridge, C (2010).** Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *J. Leukocyte Biol.*, **87(6)**, 989–999.
- Esmaeili H, Ghorani M, Arani EB, Shakeri AP (2021).** Detection of contagious ovine ecthyma (orf) and risk factors for infection in small ruminants in Iran. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **79(101714)**, 1-5.
- Evans CG, Chang L, Gestwicki JE (2010).** Heat shock proteins 70 and 90 inhibit early stages of amyloid beta-(1–42) aggregation in vitro. *J. Biol. Chem.*, **285(53)**, 41144–41154.
- Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES (1994).** CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein CED-3 and mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *J. Biol. Chem.*, **269(49)**, 30761–30764.
- Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA, O'Neill LA (2003).** Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*, **413(6851)**, 78–83.
- Fleming SB, Mercer AA, Niven DF (2015).** Orf virus: Molecular and cell biology of a parapoxvirus. *Future Microbiol.*, **10(7)**, 1115–1131.
- Fleming SB, Wise LM, Mercer AA (2015).** Molecular genetic analysis of Orf virus: A poxvirus that has adapted to skin. *Viruses*, **7**, 1505–1539.
- Gallina L, Dal Pozzo F, Mc Innes CJ, Cardeti G, Guercio A, Battilani M, Ciulli S, Scagliarini A (2006).** A real time PCR assay for the detection and quantification of orf virus. *J. Virol. Methods*, **134(1-2)**, 140–145.

Gülyaz V, Baca A, Saraç F, Sait A (2016). Contagious Ecthyma (ORF) enfeksiyonu görülen koyun ve kuzularda pestivirus varlığının araştırılması. *Etlik Vet. Mikrobiyol.* **27** (1), 12-15.

Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, **475**(7356), 324–332.

ICTV (2024). Current ICTV Taxonomy Release. ictv.global/taxonomy (Erişim Tarihi: 20.05.2024)

Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R (2008). TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon- β . *Nature Immunol.*, **9**(4), 361-368.

Kale M, Atlı K (2017). Ülkemizde koyun ve keçi yetiştiriciliğinde önemli sürü problemlerinden biri: Ektima (Orf Virus) hastalığı. Gölle Bölgesi Aylık Hakemli Ekonomi ve Kültür Dergisi Ayrıntı (**56**), 5-9.

Kampinga HH, Craig EA (2010). The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**(8), 579-592.

Karki M, Venkatesan G, Kumar A, Kumar S, Bora DP (2019). Contagious ecthyma of sheep and goats: A comprehensive review on epidemiology, immunity, diagnostics and control measures. *Vet. Arh.*, **89** (3), 393-423.

Kawai, T., Akira, S (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunol.*, **11**(5), 373-384.

Kiang JG, Tsokos GC (1998). Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol. Therapeutics.*, **80**(2), 183-201.

Kumar S (2007). Caspase function in programmed cell death. *Cell Death. Differ.*, **14**(1), 32–43.

Lawan Z, Bala JA, Bukar AM, Balakrishnan KN, Mangga HK, Abdullah FF, Mohd-Azmi ML (2021). Contagious ecthyma: how serious is the disease worldwide? *Anim. Health Res. Rev.*, **22**, 40-55.

Li F, Huang Q, Chen J, Peng Y, Roop DR, Bedford JS, Li CY (2010). Apoptotic cells activate the “phoenix rising” pathway to promote wound healing and tissue regeneration. *Sci. Signal.*, **3(110)**, ra13.

Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, **42(2)**, 145–151.

Maganga GD, Relmy A, Bakkali-Kassimi L, Ngoubangoye B, Tsoumbou T, Bouchier C, Berthet N (2016). Molecular characterization of Orf virus in goats in Gabon, Central Africa. *Viol. J.*, **12**, 1-5.

Matsunaga N, Tsuchimori N, Matsumoto T, Ii M (2011). TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules. *Mol. Pharmacol.*, **79(1)**, 34–41.

Mayer MP, Bukau B (2005). HSP70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.*, **62(6)**, 670-684.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, **388(6640)**, 394–397.

Miggin SM, O'Neill LA (2006). New insights into the regulation of TLR signaling. *J. Leukocyte Biol.*, **80(2)**, 220-226.

Muchowski PJ, Wacker JL (2005). Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nature Rev. Neurosci.*, **6(1)**, 11-22.

Multhoff G (2007). Heat shock protein 70 (HSP70): Membrane location, export and immunological relevance. *Methods*, **43(3)**, 229–237.

Nandi S, De UK, Chowdhury S (2011). Current status of contagious ecthyma or orf disease in goat and sheep—A global perspective. *Small Rumin. Res.*, **96**, 73-82.

O'Neill LA, Bowie AG (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature Rev. Immunol.*, **7(5)**, 353–364.

Oliveira CH, Assis FL, Neto JD, Oliveira CM, vora de A Lopes C, Bomjardim H, Kroon EG (2012). Multifocal cutaneous Orf virus infection in goats in the Amazon Region, Brazil. *VBZ*, **12(4)**, 336-340.

O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG (2009). The history of Toll-like receptors—Redefining innate immunity. *Nature Rev. Immunol.*, **9(6)**, 453–463.

Onyango J, Mata F, McCormick W, Chapman S (2014). Prevalence, risk factors and vaccination efficacy of contagious ovine ecthyma (orf) in England. *Vet. Rec.*, **175(13)**, 326-326.

Özmen Ö, Dolu H (2018). Pathological and electron microscopical observations on naturally occurring contagious ecthyma outbreak in two wild goats (*Capra aegagrus aegragus*). *Ankara Üniv Vet. Fak. Derg.*, **65**, 419-423.

Pal M (2018). Contagious ecthyma: An infectious emerging viral anthroponotic disease. *Acta Sci. Microbiol.*, **1(2)**, 2581-3226.

Park BS., Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4–MD-2 complex. *Nature*, **458(7242)**, 1191–1195.

Peralta A, Robles C, Martinez A, Alvarez L, Valera A, Calamante G, König GA (2015). Identification and molecular characterization of orf virus in Argentina. *Virus Gen.*, **50**, 381–388.

Pockley AG, Henderson B, Multhoff G (2008a). Extracellular cell stress (heat shock) proteins–immune responses and disease: an overview. *Philosoph. Trans. Royal Soc. B: Biol. Sci.*, **363(1512)**, 425-435.

Pockley AG, Muthana M, Calderwood SK (2008b). The dual immunoregulatory roles of stress proteins. *Trends Biochem. Sci.*, **33(2)**, 71–79.

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in TLR4 gene. *Science*, **282(5396)**, 2085–2088.

Porter AG, Jänicke RU (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.*, **6(2)**, 99–104.

Raele DA, Stoffolano JG, Vasco I, Pennuzzi G, Nardella La Porta MC, Cafiero MA (2021). Study on the role of the common house fly, *Musca domestica*, in the spread of ORF virus (Poxviridae) DNA under laboratory conditions. *Microorganisms*, **9(2185)**, 1-10.

Reed SG, Orr MT, Fox CB (2013). Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nature Med.*, **19(12)**, 1597–1608.

Riedl SJ, Shi Y (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **5(11)**, 897-907.

Saltık HS, Kale M (2017). Mavidil Virus Hastalığı. *MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg.*, **5(1)**, 32-44.

Schotte P, Declercq W, Van Huffel S, Vandenabeele P, Beyaert R (1999). Non-specific effects of caspase inhibitors in T cell apoptosis: inhibition of IL-1 β converting enzyme (caspase 1) and CPP32 (caspase 3). *FEBS Letters*, **442(1)**, 117-121.

Shkhaidem DD (2016). Characterization of Orf virus loads in ecthymous scabs for autologous vaccine development in Palestinian Sheep. Thesis of Master Degree, Palestine: Polytechnic University and Bethlehem University, Palestine.

Slee EA, Adrain C, Martin SJ (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **276(10)**, 7320-7326.

TAGEM (2022). Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü e-Bülten, 3. https://www.tarimorman.gov.tr/TAGEM/Belgeler/E_BULTEN/E-Bülten_MART%202022.pdf (Erişim Tarihi: 17.05.2024)

Tatton WG, Chalmers-Redman RM, Brown D, Tatton N, Ju WY (2001). Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann. Neurol.*, **53(S3)**, S61-S70.

Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **9(3)**, 231-241.

TÜİK. (2022). Türkiye İstatistik Kurumu: Hayvansal üretim istatistikleri. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Hayvansal-Uretim-Istatistikleri-Haziran-2022-45594> (Erişim Tarihi: 17.05.2024).

Udono H, Srivastava PK (1993). Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *J. Exp. Med.*, **178(4)**, 1391-1396.

Ülgenalp O, Koç TB, Oğuzoğlu ÇT (2018). Ruminantlarda gözlenen parapoxviruslar: tarihçe, epidemiyoloji, patogenezi, klinik bulgular, immunoterapide ve rekombinant aşılarda vektör olarak kullanımı. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **7(1)**, 551- 557.

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, **301(5633)**, 640–643.

Zhang K, Lu Z, Shang Y, Zheng H, Jin Y, He J, Liu X (2010). Diagnosis and phylogenetic analysis of orf virus from goats in China: A case report. *Viol. J.*, **7(1)**, 1-5.

Zhang Q, Wang Z, Zhang H, Li R, Ji T, Zhao Q, Chen C (2014). Characterization of a recombinant goatpox virus expressing ORFV F1L gene. *Acta Microbiol. Sin.*, **54**, 813-820.

Zhao K, Song D, He W, Lu H, Zhang B, Li C, Gao F (2010). Identification and phylogenetic analysis of an Orf virus isolated from an outbreak in sheep in the Jilin province of China. *Vet. Microbiol.*, **142**, 408–415.

Zuiderweg ER, Bertelsen EB, Rousaki A, Mayer MP, Gestwicki JE, Ahmad A (2013). Allostery in the Hsp70 chaperone proteins. *Topics in Curr. Chem.*, **328**, 99-153.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Emine Nur Dinçer

Doğum Yeri ve Yılı : ISPARTA/1999

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Uyruk : T.C

Telefon No : 05319714475

Elektronik Posta : dinceremine61@gmail.com

Ehliyet : Var

İletişim adresi : Merkez/ISPARTA



Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lisans : Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 2022

