

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI



İNAKTİF PARAPOXVİRÜSLERİN İMMUNOMODULATÖR
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Hilal ZENGİN

ELAZIĞ 2022

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mesut AKSAKAL

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri



ETİK BEYAN

Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Gürdal DAĞOĞLU danışmanlığında hazırlamış olduğum “İnaktif Parapoxvirüslerin İmmunomodulator Etkilerinin Araştırılması” başlıklı DOKTORA tezimin özgün bir çalışma olduğunu, kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Hilal ZENGİN

15 / 06 / 2022

İmza

Prof. Dr. Gürdal DAĞOĞLU

Farmakoloji ve Toksikoloji

Anabilim Dalı

ELAZIĞ

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca yardım ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten danışman hocam Sayın Prof. Dr. Gürdal Dağoğlu'na en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Doktora eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen, anabilim dalımız öğretim üyeleri Prof. Dr. Sadettin Tanyıldızı, Prof. Dr. Kadir Servi, Prof. Dr. Ahmet Ateşşahin hocalarıma ve Arş. Gör. Zeliha Keskin, Arş. Gör. Fatih Ahmet Korkak' a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışma sürecim boyunca tezimin bütün çalışma basamaklarını finanse eden ve desteklerini esirgemeyen DOLLVET BİYOTEKNOLOJİ'ye sayın Dr. Nilay Ünal, Dr. Şükran Yılmaz ve Dr. Yaser Vezir hocalarıma, Zehra Coşkun, Ramazan Gül ve Nazlı Kılıç'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak beni bugünlere getiren sevgili aileme ve bu süreçte bazen ihmal etmek zorunda kaldığım canım kızıma sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	I
ETİK BEYAN	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
TABLolar LİSTESİ	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
KISALTMALAR LİSTESİ	VIII
1.ÖZET	X
2.SUMMARY	XI
3.GİRİŞ	1
3.1. Bağışıklık (immün) Sistemi	1
3.2.1. İmmun Sistem Hücreleri	3
3.2.2.Lenfoid Organlar	4
3.3. İmmunomodulatorler	4
3.3.1.İmmunosupresanlar	5
3.3.2. İmmünostimulanlar	5
3.4. İmmunomodulatorlerin Etki Mekanizması	5
3.5. Parapoxvirus ovis	6
3.6. Infection Bovine Rhinotracheitis (IBR)	9
4. GEREÇ VE YÖNTEM	11
4.1. Gereçler	11
4.1.1. Hayvan Materyali	11
4.1.1.1. Fare Materyali	11
4.1.1.2. Sığır Materyali	11
4.1.2. Parapoxvirus ovis	11
4.1.3. Besi Ortamları	12
4.1.4. Serumlar	12
4.1.5. IBR ve iPPVO Aşıları	12
4.1.6. Real-Time PCR	12
4.1.7. ELISA Kiti	12

4.2. Yöntem	12
4.2.1. Farelerde İmmunomodulator Uygulama Çalışmaları	12
4.2.2. Sığırlarda İmmunomodulator Uygulama Çalışmaları	13
4.2.3. Kuzu Böbrek Hücre Kültürünün Hazırlanması	13
4.2.4. MDBK Hücre Kültürü Hazırlanması	14
4.2.5. Parapoxvirus ovis Üretimi	15
4.2.6. Parapoxvirus ovis Virusunun Mikrotitrasyonunun Yapılması	15
4.2.7. Parapoxvirus ovis İnaktivasyonu	16
4.2.8. Virus İnaktivasyon Kontrolü	16
4.2.9. Formülasyon, Dolum ve Liyofilizasyon	17
4.2.10. Alınan Kan Örneklerinden Total Lökosit Sayımı	18
4.2.11. Serum Nötralizasyon Testi	18
1 DKID50/göz kontrol: 50% CPE +	19
0,1 DKID50/göz kontrol: hepsinde CPE -	19
Sonuçları alındığında test geçerli kabul edilmiştir (74).	19
4.2.12. RNA Ekstraksiyonu	19
4.2.13. cDNA Sentezi	20
4.2.16. İstatiksel Analizler	22
5.BULGULAR	24
5.1. Parapoxvirus Üretiminde Kullanılacak Hücre Hattının Belirlenmesi	24
5.2. Virus İnaktivasyon Kontrolü Sonuçları	25
5.3. Farelerde TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1 β ve IL-12 Sonuçları	26
5.4. Farelerde qRT-PCR'da IL-1 β , IFN- γ ve TNF- α Sonuçları	28
5.5. Sığırlarda Total Lökosit Sonuçları	29
5.6. Sığırlarda Serum Nötralizasyon Testi Antikor Sonuçları	30
6. TARTIŞMA	32
7.SONUÇ	41
8.KAYNAKLAR	42

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: 6 günlük CPE kontrol sonuçları.....	24
Tablo 2: Farelerde kontrol ve iPPVO gruplarına ait TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1 β ve IL-12 Sonuçları	26
Tablo 3: Sığırlarda total lökosit değerleri (μ l).....	29
Tablo 4: Sığırlarda Antikor Titre Değerleri	30



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Doğal ve spesifik bağışıklığın temel mekanizmaları.....	2
Şekil 2. Lenfositlerin olgunlaşması	3
Şekil 3. Parapoxvirus'un elektron mikroskopta görünümü	7
Şekil 4. MDBK hücresinde 5.gün CPE görüntüsü.....	25
Şekil 5. Plak testi sonucu (a; 10-1 dilusyon b; 10-2 dilusyon c; 10-3 dilusyon d; 10-4 dilusyon e; 10-5 dilusyon f; 10-6 dilusyon).....	26
Şekil 6. Farelerde kontrol ve iPPVO gruplarına ait TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1 β ve IL-12 Sonuçları	28
Şekil 7. Sığırlarda total lökosit değerleri (μ l)	30
Şekil 8. Sığırlarda antikor titre değerleri	31

KISALTMALAR LİSTESİ

BCG:	Bacillus Calmette-Guerin
BoHV-1 :	Bovine herpes virus-1
CPE:	Sitopatolojik etki
CT :	Cycle of threshold
DC:	Dentrik hücreler
DMSO:	Dimetil sülfoksit
DNA:	Deoksiribonükleik asit
EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA:	Enzim-Bağlı İmmünosorbent Assay
EMEM:	Eagle's minimum essential medium
FBS:	Fetal sığır serumu
GM-CSF:	Granülosit makrofaj-koloni stimulan faktör
IBR :	Infection Bovine Rhinotracheitis
IFN-γ:	İnterferon gamma
IFN-α:	İnterferon-alfa
IFN-β:	İnterferon-beta
IL-1:	İnterlökin-1
IL-2:	İnterlökin-2
IL-8:	İnterlökin-8
IL-10:	İnterlökin-10
IL-12:	İnterlökin-12
İPPVO:	İnaktif parapoxvirus ovis
MDBK :	Madin-Darby sığır böbrek hücre hattı

mRNA:	messenger RNA
NK:	Natural Killer=Doğal Öldürücü Hücreler
NO :	Nitril oksit
PCR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
PPVO:	Parapoxvirus ovis
qPCR:	quantitative (kantitatif) PCR
RNA:	Ribonükleik asit
ROS :	Reaktif oksijen türleri
rpm:	Dakidaki devir sayısı
RPMI 1640:	Roswell Park Memorial Institute 1640 medium
TH:	Yardımcı T hücreleri- THelper
TİGEM:	Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü
TNF- α:	Tümör nekroz faktör alfa

1.ÖZET

İNAKTİF PARAPOXVİRÜSLERİN İMMUNOMODULATÖR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada; inaktif parapoxvirus ovis (iPPVO)'in Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR)'li sığırlarda serum antikor seviyeleri ve total lökosit miktarları, iPPVO uygulanan farelerde ise ELISA testi ile TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 ve RT-PCR ile TNF- α , IL-1 β , IFN- γ seviyeleri araştırıldı. Bu amaçla çalışmada 15 adet sığır ve 10 adet fare kullanıldı. Sığırlar kontrol grubu (n=5), IBR aşısı grubu (n=5) ve IBR aşısı+iPPVO grubu (n=5) olarak ayrıldı. Kontrol grubundaki sığırlara PBS, IBR grubundakilere IBR aşısı ve IBR+iPPVO grubundaki hayvanlara IBR aşısı ve iPPVO 1. ve 15. günlerde uygulandı. Uygulama yapılan tüm hayvanlardan 0, 15. ve 30. günlerde kan örnekleri alındı. Farelerde kontrol grubuna 0.1 ml PBS, iPPVO grubuna ise 0.1 ml derialtı yolla iPPVO verildi ve 10 gün sonra kan ve dalak örnekleri alındı.

Denemenin sonunda yapılan analizler sonucu; sığırlarda IBR+iPPVO grubunda, total lökosit ve serum antikor titrelerinin kontrol ve IBR gruplarına göre anlamlı olarak yüksek ($p<0.001$) olduğu görüldü. Farelerde de iPPVO grubunda TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-1 β , IFN- γ değerlerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek ($p<0.001$) olduğu tesbit edildi.

Sonuç olarak sığırlarda ve farelerde iPPVO uygulamalarının immunomodulator etki oluşturduğu ve böylece enfeksiyonların sağaltımında ve korunmasında etkili olacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: İnaktif Parapoxvirus ovis (iPPVO), immunomodulator, sığır, fare

2.SUMMARY

INVESTIGATION OF IMMUNOMODULATORY EFFECTS OF INACTIVATED PARAPOXVIRUSES

In this study; serum antibody levels and total leukocyte amounts of inactive parapoxvirus ovis (iPPVO) in cattle with infectious bovine rhinotracheitis (IBR) and in mice treated with iPPVO TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IL-1 β , IFN- γ levels investigated. For this purpose, 15 cattle and 10 mice were used in the study. Cattle were divided into control group (n=5), IBR vaccine group (n=5) and IBR vaccine+iPPVO group (n=5). The cattle in the IBR group IBR vaccine and the animals in the IBR+iPPVO group received the IBR vaccine and iPPVO on the 1. and 15. days. Blood samples were taken from all animals treated at 0, 15. and 30 days. In mice, 0.1 ml of PBS was given to the control group and 0.1 ml of iPPVO to the iPPVO group and blood and spleen samples were taken 10 days later.

As a result of the analyzes made at the end of the experiment; total leukocyte and serum antibody titers were found to be significantly higher in cattle in the IBR+iPPVO group than in the control and IBR groups ($p<0.001$). TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-1 β , and IFN- γ values were found to be statistically significantly higher ($p<0.001$) in mice in the iPPVO group when compared to the control group.

As a result, it has been determined that iPPVO application in cattle and mice creates an immunomodulatory effect and will be effective in the treatment and protection of infections.

Keywords: Inactivated parapoxvirus ovis (iPPVO), immunomodulator, cattle, mouse

3.GİRİŞ

Poxvirus ailesine ait olan Parapoxvirus ovis (Orf virüs) koyun ve keçilerde akut deri enfeksiyonlarına neden olan güçlü immunolojik özelliklere sahip DNA virusleridir. Konakçı immun savunmasından kaçmak için çoğalmalarını sağlayan çeşitli immunmodulator hücresel proteinleri kullanırlar. Parapox ovis virusu için tarif edilen ve interferon kaynaklı hücre direncine karşı koyan proteinler; viral interlökin 10 (IL-10), granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), IL-2-inhibe edici protein ve vaccinia virüsü E3L'dir (1, 2, 3, 4, 5, 6).

Parapoxvirus enfeksiyonu, konakçıda doğal öldürücü (NK) hücreler, nötrofiller, dendritik hücreler (DC), interferon-alfa (IFN- α), interlökin-1 β (IL-1 β), IL-8, granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) ve IFN-release salımında artışlara neden olmaktadır (7, 8, 9, 10, 11). Ayrıca inaktif parapoxvirusun, çeşitli türlerde baskın bir yardımcı T hücreleri (Th1) tipi immün tepkiye yol açtığı, bu tepkinin viral partikülün kendisi tarafından ortaya çıkarıldığı bildirilmiştir (12, 13, 14).

Enfeksiyöz hastalıklara karşı kullanılan immunomodulator ajanlar bağışıklığın güçlenmesini sağlayacak, hayvanların hastalıklara karşı daha direçli duruma gelmesini ve bu sebeple de antibiyotik kullanımının da ciddi oranda azalmasına neden olacaktır. Antibiyotik kullanımının azalmış olması halk sağlığı açısından bakıldığında çok büyük bir öneme sahip olduğu görülmektedir.

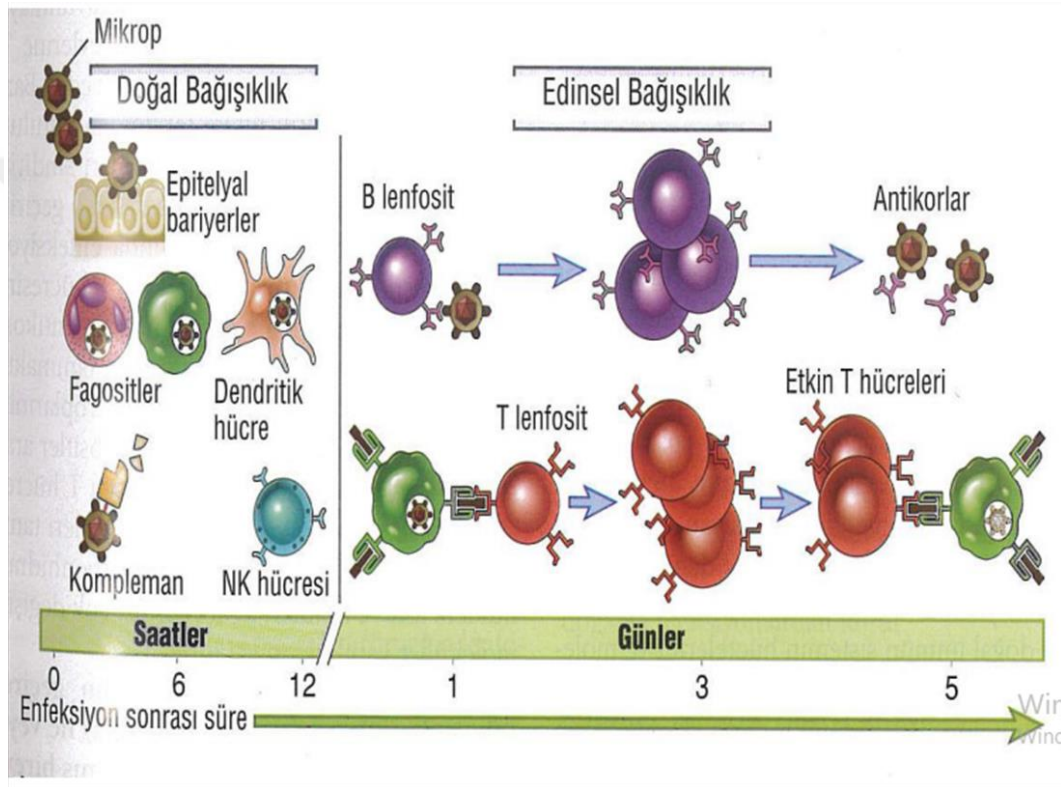
3.1. Bağışıklık (immün) Sistemi

Bağışıklık sistemi, konakçıda patojen etkenleri ve tümör hücrelerini tanıyıp onları yok eden vücudun savunma sistemidir (15, 16).

Konakçı bağışıklık sistemi, doğal (non-spesifik) bağışıklık ve spesifik (edinsel) bağışıklıktan oluşmaktadır (Şekil 1). Doğal bağışıklık enfeksiyonlara karşı ilk koruyucu engeli oluştururken spesifik bağışıklık daha sonra oluşan ve enfeksiyonlara karşı daha etkili savunma sağlayan sistemlerdir (17). Doğal bağışıklık sistemi, organizmaya ait olan hücreleri tanır fakat yabancı patojenleri tanımaz. İlk savunma aşamasını epitel dokusu ve epitelde bulunan hücreler ile

doğal antibiyotikler oluşturur. Savunmanın ikinci aşamasını ise, kimyasal sinyaller, antimikrobiyal peptidler, antifagositik ve doğal öldürücü hücreler, enflamasyon ve ateş oluşturur (18, 19).

Spesifik bağışıklık, konakçının yaşamı süresince gelişir; organizmaya ait olan maddeler ile olmayan maddeleri ayırt eder. Yabancı patojenlere ve hücrelere spesifik biçimde cevap oluşturur. Spesifik bağışıklık; T ve B lenfositlerini içerir (15).



Şekil 1. Doğal ve spesifik bağışıklığın temel mekanizmaları.

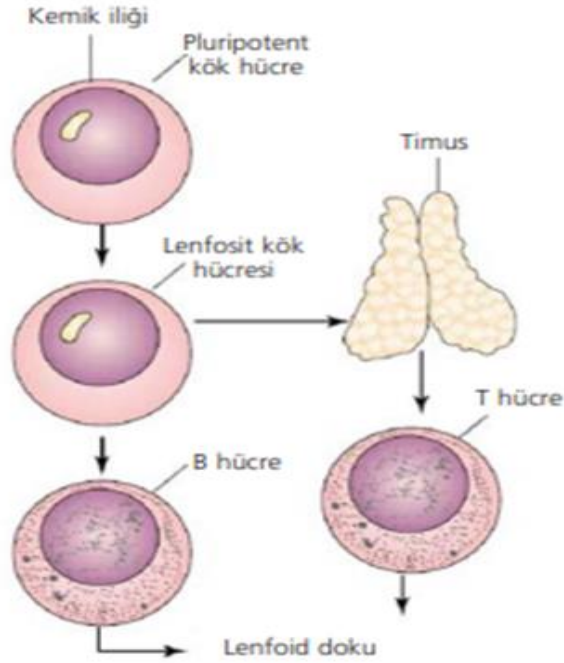
3.2. Bağışıklığın Yapısal Unsurları

Spesifik bağışıklık sistem hücreleri lenfositlerdir, ancak spesifik immün yanıtların oluşması ve aktif hale gelmesi antijene spesifik olmayan hücrelere bağlıdır (17).

3.2.1. İmmun Sistem Hücreleri

Lenfositler; hedef hastalık etkenini tanınması ve doğrudan yok etmesi nedeniyle lenfatik sistemin önemli bir unsurudur. Kemik iliğindeki kök hücrelerden üretilirler ve B ile T lenfositleri diye ikiye ayrılırlar. B lenfositleri kemik iliğinde, T lenfositleri ise timusta olgunlaşır (Şekil 2).

B lenfositleri antikor üreten tek hücre grubudur ve aynı zamanda humoral bağışıklığı düzenleyen hücrelerdir. Humoral immuniteye B lenfositlerin ürettiği antikorlar aracılık eder. Bu antikorlar dolaşıma geçerek, çeşitli sistemlerde bulunan mikropları ve mikrop toksinlerini yok ederler (16, 17, 20).



Şekil 2. Lenfositlerin olgunlaşması

T lenfositleri; kemik iliğinden köken alan ve timusta antijenik uyarılara cevap verme yeteneği kazanan ve immün sistemde hücresel bağışıklıktan sorumlu olan esas hücreleridir (16, 17, 20, 21, 22).

Doğal Öldürücü (Natural Killer, NK) Hücreler; yapı ve fonksiyonları bakımından T ve B lenfositlerden ve monositlerden farklı olan hücrelerdir.

NK hücreleri başta tümör hücreleri olmak üzere, virüsler, bakteriler ve parazitlere karşı doğal immun sistemin ilk basamağını oluştururlar. NK hücreleri bu görevlerini enfeksiyon döneminde IFN- γ sitokininin salgılanmasını artırarak yerine getirirler (17, 23).

Makrofajlar; vücuda giren yabancı maddeleri fagosit etme, T ve B hücrelerine de sitokinleri tanıtmakla görevlidirler. Makrofajlar daha önceden karşılaştıkları antijeni tanımayarak tekrar aktifleşme yeteneğine sahiptirler (22, 24).

3.2.2.Lenfoid Organlar

Lenfoid organlar vücutta yaygın biçimde bulunan ve farklı etkinlikleri olan yapılardır (15, 25, 26).

Timus, T lenfositlerinin gelişmesini sağlar. Doğum sırasında tam olarak gelişmiş bir organdır ve yaklaşık 15-20 g ağırlığındadır. Olgunlaşan T lenfositleri 2-3 gün sonra timustan ayrılır ve lenfoid dokulara gider.

Lenf Nodları, lenf damarlarına yerleşmiş küçük lenf dokusu yapılarıdır. Lenf nodlarının iki önemli fonksiyonu vardır; birincisi yabancı maddelerin kan dolaşımına girmeden lenf yolu ile uzaklaştırılmasını sağlamak ve ikincisi ise bağışıklık hücrelerinin çoğalmasını sağlamaktır.

Dalak, kırmızı ve beyaz pulpadan oluşur. Kırmızı pulpa arterler tarafından beslenen, yaşlı kan hücrelerinin yok edildiği, beyaz pulpa ise, makrofajlar ve dentritik hücrelerin etkilediği B ve T lenfositlerin toplandığı yapılardır.

Mukoza İlişkili Lenfoid Dokular, bu yapılar solunum, sindirim ve ürogenital sistemin iç kısımlarındaki membranların çevresinde bulunmaktadır. Mukozal katmanlardaki bu bağışıklık sistemleri, savunmasız iç organların korunmasına yardımcı olur.

3.3. İmmunomodulatörler

Bağışıklık sistemini düzenleyen doğal veya sentetik maddelerdir. İmmomodulatörler immunosupresanlar ve immunostimulanlar diye iki gruba ayrılır.

3.3.1.İmmunosupresanlar

Bağıışıklık sisteminin aktivitesini azaltmak için veya önlemek amacıyla kullanılan maddelere verilen isimdir. Organ nakillerinde nakil alıcılarının (kemik iliğı, karaciğer, böbrek gibi) reddini önlemek amacıyla kullanılırlar.

İmmunosupresanlar 5 gruba ayrılır;

- Glukokortkoidler; kortizol, deksametazon, prednizon, prednizolon, hidrokortizon
- Sitostatikler; siklofosfamid, metotreksat, azatioprin
- Antikorlar; poliklonal ve monoklonal antikorlar
- İmmunofilinleri etkileyen ilaçlar; siklosporin A, takrolimus, sirolimus
- Diğerleri; opioidler, mikofenolik asit (27, 28, 29).

3.3.2. İmmünostimülanlar

Nötrofillerin oksidatif aktivitesini ve fagositik hücrelerin yutma aktivitesini artırarak ve sitotoksik hücreleri uyarak etki oluşturan doğal veya sentetik maddelerdir. Otoimmün hastalıklar, viral enfeksiyonlar ve kanser gibi birçok hastalık immünostimulanlar kullanılarak tedavi edilmektedir (30, 31).

İmmünostimulanlar farklı mekanizma ve işlevlere sahip 7 gruba ayrılır. Bunlar; immünostimulan ilaçlar; levamizol, talidomid, izoprinosin, nimmunosin ve bestatindir. Bakteriyel ürünler; canlı Bacillus Calmette-Guerin (BCG), Mycobacterium bovis'in Calmette ve Guerin suşu basilinin zayıflatılmış kültürleridir. Sitokinler; çoğunlukla fagositler tarafından sentezlenen IL-1, Th1(IL-2, TNF- α , IFN- γ) ve Th2 hücreleri (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 ve 11 IL-13) dır. Kompleks karbonhidratlar ise glukanlar, trehaloz ve prebiyotikler dir (32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39).

3.4. İmmunomodulatörlerin Etki Mekanizması

İmmunomodulatörler yüzyıllardır tıpta başarı ile kullanılmaktadır. Yakın zamana kadar kullanımları tartışmalı olarak kabul edilmiş ve etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır.

İnsanlarda T hücreleri ve NK hücrelerinden proinflamator ve antiinflamator sitokin salınımını artırdıkları, buna bağlı olarak immunomodulator ve antiinflatuar etki oluşturdıkları bildirilmiştir (40, 41).

Nitrik oksit (NO) ve reaktif oksijen türleri (ROS) yangı ve bağışıklığın düzenlenmesinde önemli role sahiptirler. Nitrik oksitin immun sistem üzerindeki etkileri tam olarak açıklığa kavuşturulamamış ise de yapılan çalışmalarda lenfosit, eosinofil, monosit ve diğer hücrelerde bir çok sitokin tipinin ekspresyonunu inhibe ettiği ve lenfosit çoğalmasında rol aldığı bildirilmiştir (42, 43).

NO ve ROS' a ek olarak, sialik asitler hücre yüzeyindeki glikolipit ve glikoproteinlerin glikan zincirlerine bağlı olarak bulunan asidik monosakkaritlerdir. NO ve ROS'a ek olarak sialik asitlerin immun cevabın düzenlenmesinde, mikroorganizmaların hücreye bağlanmasında, immun hücrelerin aktivasyonunda, hücreler arası haberleşmede ve hücre tanımlanmasında önemli rolleri olduğu bildirilmiştir (44, 45).

Bağışıklık sistemi, hücresel sinyal olaylarını uyarmak için kullanılan biyolojik ajan türüne bağlı olarak farklı şekillerde (endojen veya ekzojen) modüle edilir ve genellikle immunomodülasyon olarak anılmaktadır. Faaliyetleri doğuştan gelen hücrelerin aktivasyonuna ve bunun sonucunda sitokin üretimine dayanır. İnaktif parapoxvirus ovis (iPPVO) lökositler tarafından sitokinlerin salgılanmasını uyarır ve düzenler (46).

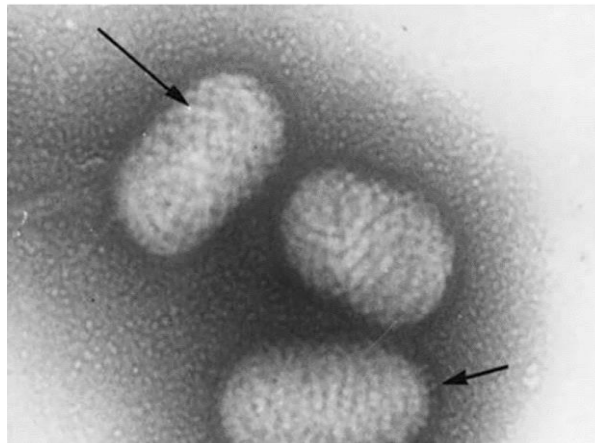
İmmün uyarıcı veya PPVO, bağışıklık sisteminin spesifik olmayan bir şekilde güçlendirilmesine neden olur. iPPVO, farelerde herpes simplex ve hepatitis B virusuna karşı sitokin (IFN- γ , IL-12, IL-18 ve TNF- α) indüksiyonunu aktive ederek bu virüslere karşı duyarlılığı azalttığı bildirilmiştir (47).

3.5. Parapoxvirus ovis

Parapoxvirus ovis, Poxviridae familyasındaki Parapoxvirus cinsinin bir üyesidir. Parapoksvirüslerin sınıflandırılması yavaş yavaş gelişmiştir ve kullanılan terminoloji üzerinde çok fazla kafa karışıklığı olmuştur. 1964'te, şimdi parapoksvirüsler olarak tanıdığımız üç virüs, "Omurgalıların Virüsleri"nde Grup II çiçek virüsleri olarak listelenmiştir.

Burada, orf hastalıkları (eşanamlılar: bulaşıcı püstüler dermatit, koyunun bulaşıcı ektimasi, boğaz ağzı, uyuz ağzı, bulaşıcı püstüler stomatit; bulaşıcı labiyal dermatit), sağım düğümleri (eşanamlılar: pseudocowpox, paravaccinia) ve stomatit papulosa (sığırlarda) dahil edilmiştir (48, 49, 50, 51). PPVO, dünya çapında koyun ve keçilerin önemli bir patojenidir ve bulaşıcı ektima, orf veya uyuz ağzı olarak bilinen mukokutanöz, enflamatuvar ve proliferatif bir hastalık oluşturur. Poxviridae ailesinin tüm üyeleri gibi oval, nispeten büyük, çift iplikli, 220-300 nm uzunluğunda ve 140-170 nm genişliğinde DNA virüsleridir (Şekil 3) (52, 53).

Parapoxvirüs viryonları karakteristik bir oval yapıya sahiptir ve bu benzersiz morfoloji, poxvirüs ailesindeki gruptan ayrı olarak dahil edilmelerinin temelini oluşturmuştur. Negatif olarak boyanmış parapoksvirüs preparatları iki şekilde görülür. Boyanın viriona nüfuz ettiği kapsül biçiminde, ince bir mazgallı zar, iç amorf bir çekirdeği çevreler gibi görünürken, lekeye karşı geçirimsiz olan viryonlar, virion boyunca çapraz bir şekilde düzenlenmiş düzenli bir tübül benzeri yapılar dizisi ortaya çıkarır. Virüsün hücre kültüründe çoğaltıldığı durumlarda, ortamda görünen viryonlar 9-18 nm kalınlığında bir membranöz yapı ile çevrilidir. Bu zarın VACV'ye benzetilerek Golgi'den türetildiği öne sürülmüştür. Görülen çapraz desen elektron mikroskobu ile görünüşe göre üst üste bindirilmiş görüntülerden kaynaklanmaktadır (48, 54).



Şekil 3. Parapoxvirus'un elektron mikroskopta görünümü

Poxviridae, güçlü immünojenik özelliklere sahip olduğu bilinen en büyük virüslerdir. *P. ovis* birçok türde güçlü immunomodülatör etki gösterir ve bu nedenle veteriner hekimlikte bakteriyel ve viral hastalıklardan korunma ve/veya destekleyici tedavi amacıyla bağışıklık sistemini uyaran biyolojik ajan olarak kullanılmaktadır. Virüsler bağışıklık sistemini atlayarak ve baskılayarak ya da bağışıklık sisteminin etkinleştirilmesiyle bağışıklık sistemini manipüle etmektedir (42, 55, 56).

PPVO'nun önemli bir özelliği, güçlü bir bağışıklık tepkisine rağmen hayvanlarda tekrar tekrar enfeksiyon gösterme yeteneğine sahip olmalarıdır. Nötralize edici antikorlar nadiren belirlenir ve reinfeksiyona karşı koruma sağlamamaktadır. Enfeksiyon oluştuğunda, PPVO, fagositoz, NK hücre aktivitesi ve çeşitli sitokinlerin üretimi (IFN- α , TNF- α , GM-CSF) dahil olmak üzere birçok doğal bağışıklık olayını kuvvetli bir şekilde uyarır (6, 57, 58).

Parapox ovis virusu için tarif edilen proteinler viral IL-10, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör, IL-2-inhibe edici protein ve vaccinia virüsü E3L geninin homologisine sahip bir genin ürünü ki bunlar interferon kaynaklı hücre direncine karşı koyarlar. Bu viral proteinler, çözünebilir büyüme faktörü homologlarını ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) , interleukin-1 β (IL-1 β), gamma interferon (IFN- γ), alfa/beta interferon (IFN- α/β) ve çeşitli kemokinleri içerir (4, 5, 7, 59, 60).

Parapoxvirus enfeksiyonu, enfeksiyon bölgesinde NK hücreler, nötrofiller ve DC'lerin birikimine yol açar. Dermal veya kandan türetilmiş dentritik hücrelerin (DC), Parapoxvirus'e karşı ilk bağışıklık yanıtında yer aldığı bildirilmiştir. Dendritik hücrelerin, Parapoxvirus ile enfekte olmuş hayvanlarda enfeksiyon bölgesinde biriktiği de açıklanmıştır (8, 9, 10, 61).

Ayrıca, Parapoxvirus IFN- α , IL-1 β , IL-8, GM-CSF ve IFN-release salınımını uyarır. Etkisizleştirilmiş Parapoxvirusun (Orf virus) ayrıca, kalitatif bir perspektiften, çeşitli türlerde baskın bir Th1 tipi immün tepkiye yol açtığı gerçeği, bu tepkinin viral partikülün kendisi tarafından ortaya çıkarıldığını gösterir (10, 11, 12, 13, 14).

İnaktif Parapoxvirüs ovis D1701 suşu (iPPVO), fare, sığır, domuz, at, köpek ve kedilerde zayıflatılmış koyun parapoxvirüsünün profilaktik veya metafilaktik tatbikatının, aujeszky hastalığı virüsü, enfeksiyöz sığır rinotrakeit virüsü, vezikülitis gibi bazı bakteriyel ve viral ajanların neden olduğu klinik semptomların azaltılmasına yardımcı olduğu kanıtlanmıştır (40, 41).

3.6. Infection Bovine Rhinotracheitis (IBR)

IBR, Bovine herpes virus-1 (BoHV-1) etkeni tarafından oluşturulan sığır, koyun, keçi, manda ve yabani ruminantlar da yaygın görülen son derece bulaşıcı, akut ve latent seyirli viral bir hastalıktır.

Herpes grubu viruslarından ileri gelen enfeksiyonlar diğerlerinde bulunmayan bir özelliğe sahiptirler. Bu enfeksiyonlarda genellikle yıllarca devam edebilen latent bir peryod vardır. Latent enfekte hayvanlar hastalık belirtisi göstermeden yıllarca hastalık etkeni virusu etrafa saçar. Bu tür hayvanlarda hem humoral ve hem de sellüler antikorlar mevcuttur. Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü IBR'yi üretim ve döl verimindeki azalma nedeniyle önemli ekonomik kayıplara neden olan bir hastalık olarak kabul etmiştir. IBR ile mücadelede koruyucu hekimlik çalışmaları büyük öneme sahiptir. Avrupa ülkelerinde bu hastalıkla mücadele sürüde seropozitiflik gösteren hayvanları kesime göndererek yapılmaktadır (62, 63, 64).

Virus, enfeksiyonun formuna göre burun, göz akıntısı, vajinal salgılar, süt, fotal membran, dokular ve sperma ile direkt ya da indirekt olarak bulaşır (65, 66).

Klinik belirtileri; rhinitis, tracheitis, mukozalarda hiperemi, pneumonie, konjunktivitis, vulvovaginitis, balanopostitis, mastitis, enteritis, dermatitis, abort, ağırlık kaybı, süt veriminde azalma ve fertilite problemleri dir (62, 67).

IBR enfeksiyonlarının teşhisi serolojik veya virusun doğrudan tespiti ile yapılmaktadır (62, 63).

IBR enfeksiyonu ve aşılama sonrasında humoral ve hücrel bağışıklık gelişmektedir. Çeşitli aşılarla (konvansiyonel, marker, canlı aşılar, inaktif aşılar) aşılamının enfekte hayvanların sayısını düşürmede ve ekonomik kayıpların azaltılmasında önemli bir mücadele sağlamaktadır (22, 64, 68).

Bu çalışmada viral bağışıklık uyarıcısı olan iPPVO uygulamasından sonra deneme hayvanlarından alınan serum ve dokularda lökosit, antikor titreleri, stokin miktarları belirlenerek iPPVO'nun immunomodulator etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda enfeksiyöz hastalıkların tedavisindeki eksikliklerin giderilmesi ve tedavilerde alternatif ajanların olup olmadığı anlaşılmaya çalışılacaktır. Bu kapsamda bilimsel çalışmalara, literatür bilgilerine ve yeni ticari ürünlerin geliştirilmesine katkı sağlanması da beklenmektedir.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Gereçler

4.1.1. Hayvan Materyali

Bu çalışmada kullanılan hayvanlar Dollvet A.Ş. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından verilen etik kurul raporu (2019/01) çerçevesinde temin edilmiş ve bu esaslara göre çalışılmıştır. Yapılan çalışmalarda kullanılan fareler Dollvet Biyoteknoloji A.Ş Deney Hayvanları Biriminden, sığırlar Urfa ilindeki süt sığır işletmelerinden, primer kuzu böbrek hücresi Ceylanpınar TİGEM çiftliğinden 1-2 aylık yaştaki kuzudan temin edilmiştir.

4.1.1.1. Fare Materyali

Daha önce aşılama geçmişi bulunmayan sağlıklı 10 adet fare (18-22 g ağırlığında 6-8 haftalık dişi İsviçre faresi, *Mus musculus*) 2 gruba ayrılmıştır.

1. Kontrol grubu (n=5), PBS uygulanan
2. iPPVO grubu (n=5), iPPVO uygulanan

4.1.1.2. Sığır Materyali

Urfa ilindeki süt sığırı işletmelerinde yaşları 6 aylıktan büyük olan ve genel muayenesi yapılarak klinik olarak sağlıklı olduğu belirlenen 15 adet sağlıklı sığır 3 gruba ayrılmıştır.

1. Kontrol grubu(n=5), PBS uygulanan
2. IBR grubu (n=5), IBR aşısı uygulanan
3. IBR+iPPVO grubu (n=5), IBR+iPPVO uygulanan

4.1.2. Parapoxvirus ovis

Bu çalışmada kullanılan E(P)CK22 çalışma tohum suşu Dollvet Virüs Bankası stoklarında bulunan ve rutinde kullanılan laboratuvar suşlarından seçilmiştir.

4.1.3. Besi Ortamları

RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640 medium, Cegrogen, Germany), fare dalaklarından hazırlanan hücre kültürünün büyütülmesinde kullanılmıştır.

EMEM (Eagle's minimum essential medium, Sigma, ABD), MDBK hücrelerinin kültürlerinde %10'luk, virüs üretiminde %2'lik oranları kullanılmıştır.

4.1.4. Serumlar

Hücre ve virüs üretiminde, ABD orijinli fütal sığır serumu (FBS) (Biowest, ABD) kullanılmıştır.

4.1.5. IBR ve iPPVO Aşıları

Aşılama çalışmasında Dollvet A.Ş. tarafından temin edilen infectious bovine rhinotrachitis (IBR) inaktif aşısı (BIOBOS IBR MARKER IN, Bioveta A.Ş.), inaktif parapoxvirus immunomodulatorü olarak ise Dollvet A.Ş. Ar-ge merkezinden elde edilen aşı kullanılmıştır.

4.1.6. Real-Time PCR

PureLink™ RNA Mini Kit (İnvitrogen, ABD)

SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (İnvitrogen, ABD)

FastStart Essential DNA Green Master (Roche, ABD)

4.1.7. ELISA Kiti

MTL ELISA Kit (Bioassay Technology Laboratory)

4.2. Yöntem

4.2.1. Farelerde İmmunomodulator Uygulama Çalışmaları

Hayvan grupları sırasıyla;

1.Kontrol grubu (n=5), 1. gün 0.1 ml derialtı PBS uygulandı

2.iPPVO grubu (n=5), 1. gün 0.1 ml derialtı iPPVO uygulandı

Uygulamalardan 10 gün sonra kan alındı, fareler izofluran ile anesteziye alındı, steril şartlarda servikal dislokasyon ile dalakları çıkarıldı. RNA ekstraksiyonu yapılana kadar – 80 °C’ de saklandı

4.2.2. Sığırlarda İmmunomodölatör Uygulama Çalışmaları

Hayvan grupları sırasıyla;

1. Kontrol grubu (n=5), 1. ve 15. gün derialtı 2 ml PBS uygulandı, 0. 15. ve 30. gün kan alındı.
2. IBR grubu (n=5), 1. ve 15. gün kasiçi 2 ml IBR uygulandı, 0. 15. ve 30. gün kan alındı.
3. IBR+iPPVO grubu (n=5), 1. ve 15. gün kasiçi 2 ml IBR+derialtı 2 ml iPPVO uygulandı, 0. 15. ve 30. gün kan alındı.

Gruplardaki 15 sığırın vena jugularis’inden jelli tüp ve EDTA’lı tüplere kan örnekleri alındı. Biyokimyasal analizler için alınan kan örnekleri oda ısısında 15 dakika bekletildikten sonra 1000 rpm’de ve 10 dakika santrifüj edilerek serumu çıkarıldı ve analizler yapılançaya kadar -20°C’de saklandı. EDTA’lı tüplere alınan kan örneklerinden kan frotileri hazırlandı, total lökosit ve serum nötralizasyon testleri yapıldı.

4.2.3. Kuzu Böbrek Hücre Kültürünün Hazırlanması

Ceylanpınar TİGEM çiftliğinden temin edilen böbrekler +4 °C’de PBS içinde laboratuvara getirildi. Güvenli laboratuvar koşullarında önce steril saf alkol ile yıkandı daha sonra 5x antibiyotikli (ampB+strep/pen+gentamisin) PBS ile tekrar yıkanarak alkol uzaklaştırıldı. Böbreklerin üzerindeki yağ tabakası temizlenmiş ve böbreği çevreleyen zar organa zarar verilmeden çıkarılmıştır.

Daha sonra makas ve pens yardımıyla böbreklerin korteks kısımlarından küçük parçalar ayrılmıştır. Bu küçük parçalar steril erlen içerisine alınmış, üzerine PBS ilave edilmiştir. Bulanıklık kayboluncaya kadar ortalama 3-4 defa PBS ile

yıkanmıştır. Sonra parçaların üzerini rahatça kaplayacak miktarda % 0,5 tripsin solüsyonu ilave edilmiştir. Şişe içerisine manyetik balık bırakılarak manyetik karıştırıcı üzerinde 15 dakika oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Tripsinin enzimatik etkisiyle serbest kalan hücrelerin bulunduğu tripsin solüsyonu içerisindeki doku parçalarının dibe çökmesi beklenerek süpernatant kısım içerisinde FBS olan ayrı bir cam şişede toplanmıştır. Bu işlem organ parçalarının tamamı dağılana kadar tekrarlanmıştır.

Toplanan tripsin solüsyonu steril bir tülbentten geçirilerek santrifüj tüplerine taksim edilmiş ve 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra hücre sayımı hemositometre kullanılarak ışık mikroskobunda yapılmış ve sayım sırasında hücre canlılığı da kontrol edilmiştir.

Sayımı yapılan hücre mililitre'de 4×10^5 hücre/ml olacak şekilde 37 °C ısıdaki % 10 FBS içeren EMEM vasatı ile sulandırılarak uygun hacimdeki flasklara aktarılmış ve 37 °C'de ve % 5 CO₂'li ortamda monolayer hücre kültürü oluşması için inkubasyona bırakılmıştır. 48 saat sonra hücreler doku kültürü mikroskobunda incelenmiş ve üremeye bağlı olarak besi yeri yenilenmiştir.

% 100 monolayer olduktan sonra bir flask kontrol testleri için pasaj yapılmıştır, diğerleri ise dondurularak saklanmıştır. Kalite Kontrol Laboratuvarı tarafından sterilite testleri ve ekstra ajanlar yönünden kontrolleri yapılmıştır.

Hücrelerin dondurulması: Monolayer hücreler, % 0,3 tripsin solüsyonu içerisine % 3 oranında % 0,25 EDTA karıştırılarak tripsinize edilmiştir. 800-1000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilmiş, % 10 DMSO ve % 90 FBS ilave edilerek ml'de 107 olacak şekilde sulandırılmıştır. Karışımdan her cryo tüpe 1 ml konarak, bir gece -80 °C'de bırakıldıktan sonra -150 °C' ye yerleştirildi (69).

4.2.4. MDBK Hücre Kültürü Hazırlanması

-150 °C'de bankalama yapılan hücre cryovialı çıkartılarak hızlı bir şekilde çözdürüldü, 5 dakika 800 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant dökülerek, geriye kalan pelet üzerine % 10 FBS'li vasat eklenip cryo üzerindeki etikete uygun olarak hücre ekimi yapılmıştır.

Hücre sayımı hemositometre kullanılarak ışık mikroskopunda yapılmış ve sayım sırasında hücre canlılığı da kontrol edilmiştir (69).

4.2.5. Parapoxvirus ovis Üretimi

Virus üretiminde kullanılmak üzere 85 ± 5 °C’de saklanan çalışma tohum suşundan bir adet cryovial çıkartılarak hızlı bir şekilde çözündürülmüştür. Döner şişelerde monolayer olmuş primer MDBK hücre kültürlerinin % 10 FBS serumu içeren besiyeri dökülerek ve EMEM ile 3 kez yıkanmıştır. E(P)CK23 çalışma tohum suşu 0,1 ml olacak şekilde 20 ml EMEM besiyeri ile sulandırılıp MDBK hücre kültürlerine inokule edilerek ve 37 °C’de bir saat adsorbsiyona bırakılmıştır.

Adsorbsiyon süresi sonunda % 2 FBS’ li EMEM ilave edilerek ve 37 °C’de inkubasyona bırakılmıştır. İki günde bir hücrelerin vasatı % 2 FBS içeren EMEM ile değiştirilmiştir. İnverted mikroskopta CPE % 80-90 olarak tespit edildiğinde virüs toplama işlemi yapılarak ve -85 ± 5 °C’de muhafaza edilmiştir. Toplanan virüsler iki kez dondurulup çözündürülerek bir araya getirilmiştir. 3000 rpm’de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı virüs süspansiyonu olarak saklanmıştır (70).

4.2.6. Parapoxvirus ovis Virusunun Mikrotitrasyonunun Yapılması

Virusun enfektif güç tayini için MDBK kullanılmıştır. Monolayer olmuş MDBK hücresi tripsinize edilerek $2,5\times10^5$ hücre/ml olacak şekilde %10 FBS’ li EMEM ile hazırlanmış hücre süspansiyonundan 100 µl platin tüm gözlerine eklenmiştir.

Hücre kontrol gözlerine ise serumsuz EMEM vasatından 100 µl eklenmiştir. Virusun serumsuz EMEM vasatı ile Log10 tabanına göre 10^{-1} den 10^{-7} ye kadar dilüsyonları yapılmıştır. Her dilüsyondan en az 10 göz olmak üzere mikro platin gözlerine 100µl eklenerek 37 °C’de % 5 CO₂’li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Her gün doku kültürü mikroskopunda CPE oluşumu yönünden kontrol edilmiş 5. günün sonunda virus titresi (doku kültürü enfektif doz 50-DKID50)spaermen-kaerber metoduna göre yapılmıştır(70).

Spaermen-Kaerber Metodu

$$(X_0 - d/2 + d \cdot x(r/n))$$

X₀= En son hepsinin (+) olduğu log₁₀'u

d = Sulandırma faktörü log 10'u (0,5)

r = X₀ ve daha sonraki sulandırmalarda tespit edilen CPE pozitif gözlerinin toplamı

n = Her sulandırma basamağı için kullanılan konakçı sistem sayısı(dolu pleytlerin sayısı)

4.2.7. Parapoxvirus ovis İnaktivasyonu

Toplanan virüs süspansiyonu iyice karıştırılarak homojenize edilmiştir. Final hacimde 3 mM olacak şekilde BEI ilavesiyle inaktive edilmiştir. Karışım homojenize edildikten sonra, başka bir kaba aktarılıp, 36±1°C'de 24 saat inkube edilmiştir. Daha sonra hazırlanan sodyum tiyosülfat solüsyonundan % 0,2 oranında katılarak BEI etkinliği nötralize edilmiştir. İnaktivasyon kontrolü için numune alınmıştır (70,71).

4.2.8. Virus İnaktivasyon Kontrolü

İnaktivasyon kontrolü için 2 ayrı yöntem kullanılmıştır;

Hücre kültüründe 3 kör pasajlama, Hücre Kültürü Üretim Laboratuvarı'ndan MDBK hücre kültürü alındı. % 100 monolayer oluşturmuş MDBK hücre kültürü % 10 FBS içeren besiyeri dökülerek 3 defa EMEM vasatı ile yıkanmıştır. İnaktif edilen virüs süspansiyonundan 0,1 ml alınarak 20 ml EMEM vasatı ile birlikte sulandırılıp inokule edilmiş ve 37 °C' de bir saat adsorbsiyona bırakılmıştır. Adsorbsiyon süresi sonunda % 2 FBS serumu içeren EMEM besiyeri ilave edilmiş ve 37 °C'de inkubasyona bırakılmıştır. İnverted mikroskopta günlük kontrol edilerek herhangi bir CPE oluşumu olup olmadığı gözlenmiştir. CPE oluşumu görülmediğinde -20 °C'de dondurulmuştur.

2. pasaj için dondurulan ilk flask çözündürölüp 0,1 ml alınarak aynı işlemler tekrarlanmış. CPE oluşumu görölmediğinde tekrar -20 °C’de dondurulmuştur. 3. pasaj için bir önceki pasajda dondurulan flask çözündürölüp 0,1 ml alınarak işlemler tekrarlanmış. CPE oluşumu olmadığı gözleendiğinde ise antijenin inaktif olduğuna karar verilmiştir.

Plak test ile virüs varlığının kontrol edilmesi, inaktif edilen virüs süspansiyonundan alınan numune, % 90 yüzeyi kaplamış MDBK hücresi içeren 0,1 ml/göz olacak şekilde pleyltler ekimi yapılmıştır. Platlar % 5 CO₂’li inkübatörde 1 saat adsorbsiyonu sağlandıktan sonra 121 °C’de 30 dk otoklavlanarak steril edildikten sonra % 1.3’lük gum örtme besiyeri EMEM besiyeri ile karıştırılarak her göze 2 ml konup, 48 saat % 5 CO₂’li 37 °C inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresinin sonunda pleyltlerdeki besiyeri dökölerek her göze 2 ml PBS de hazırlanan % 2,5’lik kristal viyole boya solüsyonundan (%20 formol ve %2,5 kristal viyole) eklenmiştir. 30 dakika sonra boya dökölerek suyu ile yıkanıp oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Plakların değeriendirilmesi, platların son gözlerdeki plaklar sayılmıştır. Sayılan plakların sayım ortalamaları alındı ve aşağıdaki formölde yerine konarak, enfektivite titresi pfu/ml olarak hesaplanmıştır (70, 71).

Plakların sayıldığı dilüsyon x otalama plak sayısının logaritması

Enfektivite = -----

İnkübasyon hacmi

4.2.9. Formulasyon, Dolum ve Liyofilizasyon

Formulasyonu tamamlanmış inaktif parapoxvirus bulkı 1/1 oranında PLV ile karıştırılarak, liyofilizasyonu yapılmak üzere Dollvet A.Ş. Dolum Ünitesi birimine teslim edilmiştir. Doluma girmeden önce liyofilize edilecek her ürünün önceden tanımlanmış bir ürün reçetesi bulunmaktadır (72) .

4.2.10. Alınan Kan Örneklerinden Total Lökosit Sayımı

Total lökosit sayımı için alınan kan örnekleri nattherick eriyiği 100 kat sulandırılarak 1 damla thoma lamına damlatıldıktan sonra kan lamel boyunca tam olarak yayıldıktan sonra kurutuldu. Kurutulan frothin üzerine 5 ml metil alkol yayıldıktan sonra 3-5 dakika sonra metil alkol dökülüp froti havada kurutuldu. Ölçü silindirine her froti için 5ml saf su konur ve üzerine her ml suya 1 damla gimza boyası ilave edilir. Su ve boya hafif sallayarak karıştırılır. Hazırlanan gimza boyası froti üzerine yayıldı, 30 dakika bekletildi ve sonra boya döküldü. Froti saf sudan geçirildi, kurumaya bırakıldı. Kurutulan frotide total lökosit sayımı yapıldı (73).

4.2.11. Serum Nötralizasyon Testi

Sığır ve farelerden alınan kan serumlarında nötralizan antikorların varlığını ortaya koymak amacıyla serum nötralizasyon testi yapılmıştır.

Hayvanlardan elde edilen kan serumları 56°C'de 30 dakika inaktive edilmiştir. 96 kuyucuklu platin bütün kuyucuklarına 50'şer µl EMEM eklenerek, her bir kan serumu örneğinden 50'şer µl platin kuyucuklarına eklenmiştir.

Kuyucuklarda iki kat PBS ile dilusyonu yapılan serum örneklerinin üzerlerine 50 µl 100 DKID 50/50 µl de titrede Dollvet A.Ş'inden temin edilen standart virüs suşu (IBR 864 MDBK Ank4 P1) eklenmiş ve 37 °C'de bir saat nötralizasyona bırakılmıştır. İnkubasyon süresi sonunda önceden 96 gözlü pleytlerde monolayer olarak üretilen $1,5 \times 10^5$ MDBK hücre/ml süspansiyonundan 50'şer µl eklenerek 37 °C'de %5 CO₂'li ortamda 5 gün inkübe edilmiştir. Her gün hücreler CPE oluşumları yönünden kontrol edilmiştir. Bu değerlendirmeler sonunda virüs kontrol gözlerinde;

100 DKID50/göz kontrol: %100 CPE +

10 DKID50/göz kontrol: %100 CPE +

1 DKID50/göz kontrol: 50% CPE +

0,1 DKID50/göz kontrol: hepsinde CPE -

Sonuçları alındığında test geçerli kabul edilmiştir (74).

4.2.12. RNA Ekstraksiyonu

iPPVO uygulanan farelerden alınan dalaklar, üreticinin önerdiği prosedürlerle ticari bir PureLink™ RNA mini kiti (İnvitrogen, ABD) ile ekstrakte edildi.

Çıkarılan dalak örneklerine aşağıdaki işlemler uygulanmıştır;

1. -80 °C' den çıkarılan dalaklar biyogüvenlik sınıf II kabinde açılarak petriye alındı.
2. Krem kıvamına gelinceye kadar bistüri ile ezildi.
3. 1 ml lysis buffer + 2-mercaptoethanol karışımı eklenerek, homojen bir görüntü elde edene kadar pipetlendi.
4. İki dakika boyunca vortekslendi.
5. 12.000 g'de iki dakika santrifüj edildi.
6. 1 ml % 70'lik etanol eklendikten sonra vortekslendi.
7. 700 µl alınarak spin kolon tüpüne aktarıldı.
8. 12.000 g'de 20 dakika santrifüj edildi.
9. Bu işlem örnek bitinceye kadar tekrarlandı.
10. 700 µl Wash Buffer I solüsyonundan eklenip, 12.000 g'de 20 dakika santrifüj edildi.
11. Santrifüj sonrası yeni bir spin kolon tüpüne alınarak, 500 µl Wash Buffer II eklenerek, 12.000 g'de 20 dakika santrifüj edildi ve bu işlemler iki defa tekrarlanmıştır.
12. Oda ısısında 12.000 g'de 2 dakika santrifüj edilerek, bağlı RNA membranının kurutulması sağlandı.
13. Spin kolon tüpü steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne konuldu ve 50 µl RNase-Free Water eklendikten sonra bir dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi ve elüsyon için 14.000g'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi.

14. Elde edilen saf RNA örnekleri kullanılıncaya kadar -40 °C’de muhafaza edildi.

4.2.13. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA örneklerinden SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (İnvitrogen, ABD) kullanılarak, üreticinin vermiş olduğu prosedürlere uygun şekilde cDNA sentezi yapılmıştır.

cDNA sentezi için aşağıdaki işlemler uygulanmıştır;

1. Kullanılacak kimyasallar ilk olarak 1000 g’de iki dakika santrifüj edildi.
2. Aşağıda oranları belirtilen karışım cryovial tüpte hazırlanıp, 65°C’de 5 dakika inkübe edildi.

up to 5 µg total RNA n µL	2 µl
Primer* *50 µM oligo(dT)20	2 µl
10 mM dNTP mix	2 µl
DEPC-treated water to 10 µL	4 µl

3. İnkubasyon sonrası cryovialler buz üzerine alınarak 2 dakika beklenildi.
4. Aşağıda bir reaksiyon için oranları belirtilen cDNA sentezi karışımı hazırlandı.

10X RT buffer	2 µL
25 mM MgCl ₂	4 µL
0.1 M DTT	2 µL
RNaseOUT™ (40 U/µL)	1 µL
SuperScript® III RT (200 U/µL)	1 µL

5. Her bir RNA/primer karışımına 10 µl cDNA karışımından eklenerek yavaşça pipetlenerek, santrifüj edildi.
6. Santrifüj edildikten sonra 50 °C’de 50 dakika inkübasyona bırakıldı.
7. Reaksiyonlar 85°C’de 5 dakika sonlandırılır ve buz üzerinde soğutuldu.
8. Herbir cryovial tüpe 1 µl RNase H eklenerek 20 dakika 37 °C’de inkubasyona bırakıldı.
9. Hazırlanmış olan cDNA kullanılıncaya kadar -40 °C’de muhafaza edildi.

4.2.14. Real-Time PCR Protokol

PCR cihazına yüklenecek cDNA örnekleri aşağıdaki gibi 1/5 oranında Nuclease Free Water ile seyreltilmiştir. Aşağıdaki miktarlarda reaksiyon platler üzerine dağıtıldı;

2X Probe Master Mix	12,5 µl
Primer/F	2 µl
Primer/R	2 µl
Nuclease Free Water	4 µl
cDNA	2,5 µ

Ayrıca sitokin mRNA'larının belirlenmesi için qPCR’de kullanılan primer çiftleri aşağıda gösterilmiştir.

b-actin F: AGGCCAACCGTGAAAAGATGACCCAGAT	139 bp
R: GTAGACCATGTAGTTGAGGTCAATGAA	
IL-1β F: TGGCCTTCAAAGGAAAGAATCTATACCTGTCC	179 bp
R: GTTGGGGAACCTCTGCAGACTCAAACCTCCAC	
TNF-α F: CAGGCCTTCCTACCTTCAGACCTTCCAGAT	166 bp
R: ACACCCCGCCCTTCCAAATAAATACATTCAT	
IFN-γ F: GCCAAGACTGTGATTGCGGGGTTGTATCT	178 bp
R: TAAAGCGCTGGCCCGGAGTGTAGACA	

CFX Connect BIORAD Real-Time PCR cihazında 50 °C’de 2 dakika, 95 °C’de 10 dakika inkubasyonla polimeraz enzimi aktive edildi. Daha sonra 95 °C’de 20 saniye, 59 °C’de 1 dakika olmak üzere 39 siklus (döngü) PCR cihazında inkübe edildi. Erime eğrisini belirlemek için, Real-Time PCR cihazı, floresanı 55 ile 95 °C arasında 1 °C’lik artışları her 1 saniyede bir tane okuyacak şekilde ayarlandı. Hedeflenen gen transkriptler, Δ CT metodu kullanılarak hesaplanmıştı (58, 67).

4.2.15. ELISA Testi

Her bir sitokine özgü ELISA kiti dilüsyonları PBS ile hazırlandı, dilüsyonlar 96 gözlü pleytin tüm gözlerine 100 µl eklendi, +4 °C’de 24 saat bekletildi. Kaplanan pleytlerin tüm gözleri 250 µl yıkama solüsyonu ile 3 defa yıkandı, bütün gözlere 150 µl Blocking buffer (100ml PBS+2gr Kazein+50µl Tween 20) eklenerek etüvde 37 °C ‘de 1,5 saat bekletildi. Ayrı bir U buttom pleyte serum gruplarının her birinden 120µl eklendi ve ½ oranında serum dilüsyonu yapıldı. Pleytin tüm gözleri 250 µl yıkama solüsyonu ile 3 defa yıkandı.

Hazırlanmış olan serum dilüsyonları en son dilüsyondan başlanarak antiijen kaplı pleyte aktarıldı. Etüvde 37 °C’de 1 saat bekletildi. Pleytin tüm gözleri 250 µl yıkama solüsyonu ile 3 defa yıkandı. 1/30.000 Anti-rabbit konjugatı her göze 100 µl eklenerek 37 °C’de etüvde 1 saat bekletildi. Pleytin tüm gözleri 250 µl yıkama solüsyonu ile 3 defa yıkandı. Pleytin tüm gözlerine 100 µl substat eklenerek oda ısısında ışık görmeyecek şekilde 25-30 dakika bekletildi. Tüm gözlere 100 µl stop solüsyonu eklenerek 450 nm’de okutuldu.

4.2.16. İstatiksel Analizler

Verilerin istatiksel analizinde IBM SPSS Statistics Versiyon 22.0 paket programı kullanıldı. Sürekli ölçümler ortalama ve standart sapma olarak özetlendi. Sürekli ölçümlerin normal dağılım varsayımını sağlayıp sağlamadığı Shapiro Wilk testi ile test edildi. Gruplar arasında sürekli ölçümlerin karşılaştırılmasında Bağımsız gruplarda T testi kullanıldı.

Birden fazla grup değişkeni (gün ve grup) olduğu durumlarda sürekli ölçümlerinin genel karşılaştırılmasında İki Yönlü Varyans Analizi (two way ANOVA) kullanıldı.

Grupların ikili karşılaştırılmalarında Bonferroni, Turkey testleri kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak alındı.



5.BULGULAR

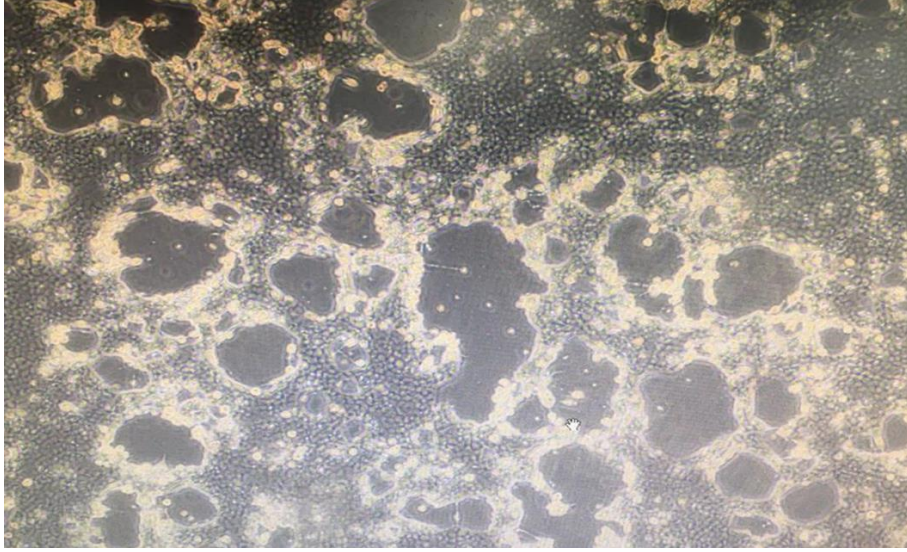
5.1. Parapoxvirus Üretiminde Kullanılacak Hücre Hattının Belirlenmesi

Parapoxvirus üretiminde optimum şartların sağlanması için farklı hücre ortamları ile deneme Parapoxvirus üretim çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Parapoxvirus sığır ve koyun orijinli epitelial, böbrek orijinli primer ve sekonder hücre kültürlerinde CPE oluşturularak üretilmektedir. Bu tez çalışmasında hem primer hücre kültürü hem de cell line hücre hattı kullanılarak virusun üretimi için gerekli en uygun şartları oluşturmayı amaçladık. Bu amaçla Primer Kuzu Böbrek ve MDBK hücre kültürlerinde virüs inokülasyonları yapılmıştır. E(P)CK22 çalışma tohum suşundan Kuzu böbrek ve MDBK hücrelerine 0.1 ml inokülasyonu yapılarak 37 °C’de 1 saat adsorbsiyona bırakılmıştır. Adsorbsiyon sonrası virüs üretim vasatı (EMEM) eklenerek 37 °C’de etüve bırakılmıştır. CPE oluşumları 6 gün süreyle takip edilerek sonuçları kayıt altına alınmıştır (Tablo 1).

Tablo 1: 6 günlük CPE kontrol sonuçları

Hücre Adı	1.Gün	2.Gün	3.Gün	4.Gün	5.Gün	6. Gün
Kuzu Böbrek	CPE oluşumu görülmedi	CPE oluşumu görülmeye başlandı	CPE oluşumu gözlemlendi	CPE oluşumu gözlemlendi	%80-90 CPE oluşumu gözlemlendi	—
MDBK	CPE oluşumu görülmeye başlandı	CPE oluşumu gözlemlendi	CPE oluşumu gözlemlendi	CPE oluşumu gözlemlendi	%80-90 CPE oluşumu gözlemlendi	—

Günlük CPE görüntüleri kaydedilerek, %80-90 CPE oluşumu gözlemlendiğinde virus toplama işlemi yapılmıştır (Şekil 4). Uygun hücre ortamını belirlemek amacı ile virus titrasyonları yapılmıştır. MDBK hücrelerinde üretilen virus titresi (doku kültürü infeksiyöz doz 50-DKID50) Kaerber yöntemine göre 106, Primer kuzu böbrek hücrelerinde ise 105,2 olarak hesaplanarak uygun ortam MDBK hücreleri olarak belirlenmiştir.

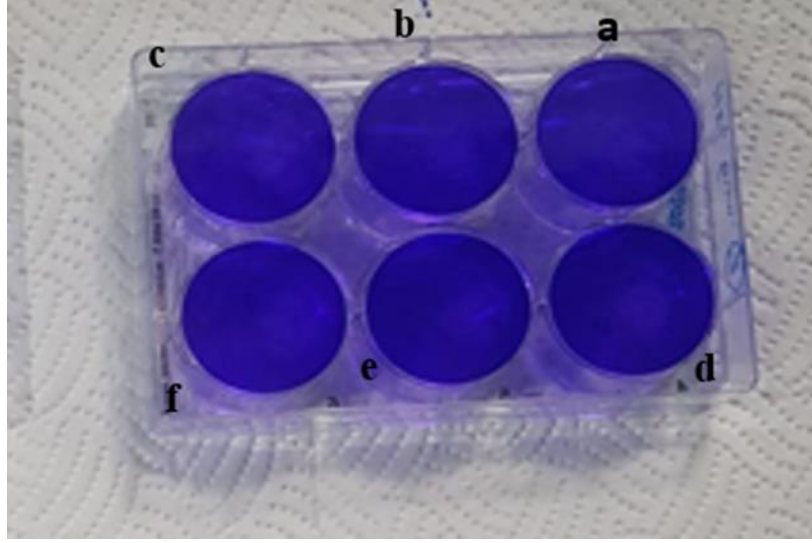


Şekil 4. MDBK hücresinde 5.gün CPE görüntüsü

5.2. Virus İnaktivasyon Kontrolü Sonuçları

BEI ile inaktive edilen Parapoxvirus' un inaktif olduğunu kanıtlamak için 3 kör pasaj yapılmıştır. 1 adet 175 cm²'lik flasklarda hazırlanan MDBK hücrelerine inaktif edilmiş virus 0.1 ml inokule edilerek 3 gün boyunca CPE kontrolü yapılmıştır. CPE oluşumu görülmediğinde flask -20 °C' de dondurulup çözdürüldükten sonra santrifüj edilerek süpernatant kısımları alınıp tekrar hazırlanmış olan 1 adet 175 cm²'lik MDBK hücrelerine 0,1 ml inokulasyonu yapılmıştır. Bu işlem 3 defa tekrar edilmiş ve CPE oluşumu görülmediğinden inaktif olduğuna karar verilmiştir.

İnaktif edilen virüs bulktan alınan numune ile her göze dilüsyon oranlarına uygun şekilde 0.1 ml inaktif virüs inoküle edilmiştir. Yapılan plak testinde plak oluşumu görülmediği için virüs inaktif kabul edilmiştir (Şekil 5).



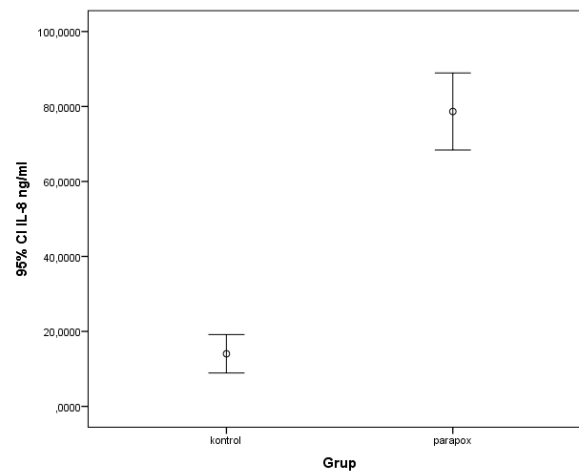
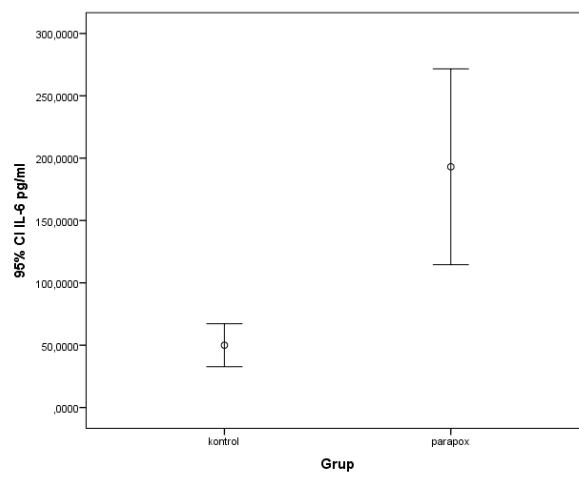
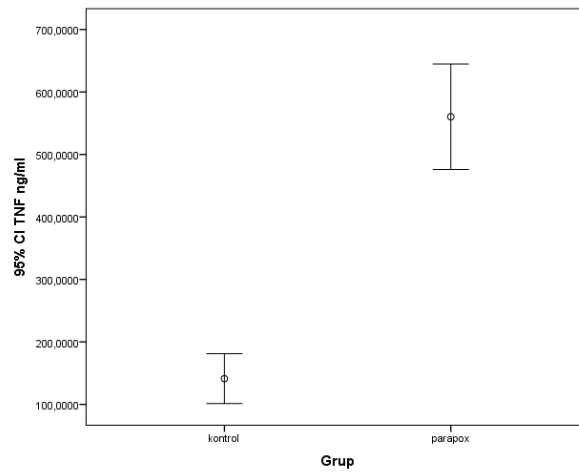
Şekil 5. Plak testi sonucu (a; 10-1 dilusyon b; 10-2 dilusyon c; 10-3 dilusyon d; 10-4 dilusyon e; 10-5 dilusyon f; 10-6 dilusyon)

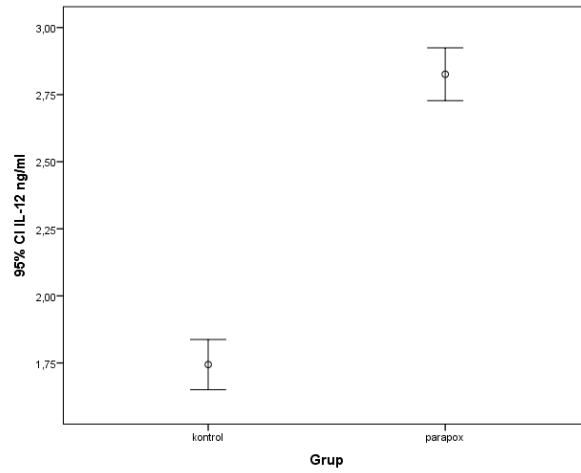
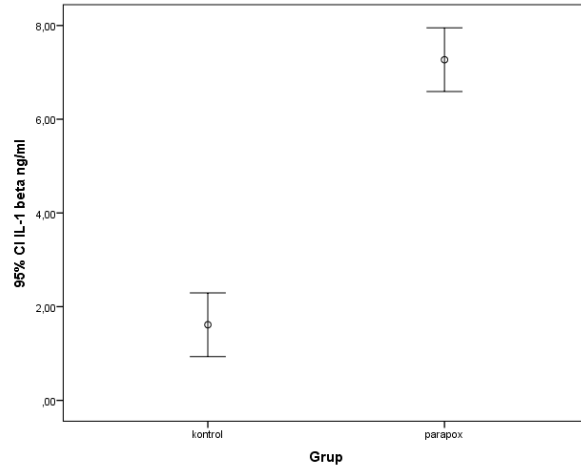
5.3. Farelerde TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1 β ve IL-12 Sonuçları

Tablo 2: Farelerde kontrol ve iPPVO gruplarına ait TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1 β ve IL-12 Sonuçları

ng/ml	Grup		p değeri
	Kontrol	Parapox	
TNF-α	141.188 $\pm$ 32.176	560.312 $\pm$ 67.921	<0.001
IL-6	49.996 $\pm$ 13.877	193.060 $\pm$ 63.222	0.001
IL-8	14.030 $\pm$ 4.121	78.670 $\pm$ 8.275	<0.001
IL-1β	1.614 $\pm$ 0.547	7.270 $\pm$ 0.548	<0.001
IL-12	1.744 $\pm$ 0.075	2.826 $\pm$ 0.079	<0.001

Kontrol ve parapox gruplarına göre TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1 β ve IL-12 değerlerinin tanımlayıcı istatistikleri ve p değerleri Tablo 2’de verilmiştir. TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1 β ve IL-12 değerlerinin parapox ortalamaları kontrole göre daha yüksektir ve bu fark her değer için istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.





Şekil 6. Farelerde kontrol ve iPPVO gruplarına ait TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1 β ve IL-12 Sonuçları

5.4. Farelerde qRT-PCR'da IL-1 β , IFN- γ ve TNF- α Sonuçları

Actin değeri 1 iken,

IL-1 β değeri normalden 7.3 kat fazla

IFN- γ değeri normalden 842.8 kat fazla

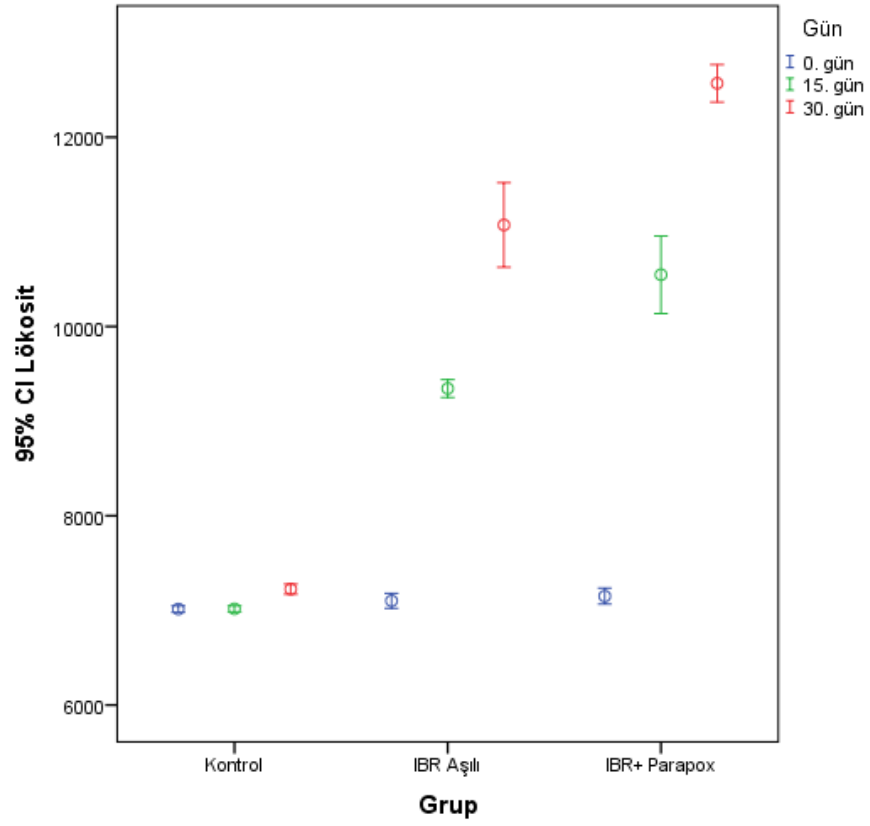
TNF- α değeri normalden 409 kat fazla olarak hesaplanmıştır.

5.5. Sığırlarda Total Lökosit Sonuçları

Tablo 3: Sığırlarda total lökosit değerleri (μ l)

Lökosit Sayısı	Grup		
	Kontrol	IBR	IBR+Parapox
0. gün	7015.00 $\pm$ 27.613	7102.00 $\pm$ 63.699	7151.00 $\pm$ 67.768
15. Gün	7017.00 $\pm$ 25.884	9345.00 $\pm$ 76.240	10547.00 $\pm$ 329.689
30.Gün	7225.00 $\pm$ 43.157	11073.00 $\pm$ 359.298	12570.00 $\pm$ 159.531
Zaman değişimi için p değeri	<0.001		
Grup için p değeri	<0.001		
Zaman*grup değişimi için p değeri	<0.001		

Tablo 3’de lökosit sayısının zaman ve grup değişimine göre elde edilen tanımlayıcıları ve p değerleri verilmiştir. Elde edilen bulgulara göre her grupta zaman değişimi anlamlıdır ($p<0.001$). Bu anlamlılık zaman ilerledikçe ortalamanın yükselmesi şeklindedir. Ayrıca grup değişimi incelendiğinde en yüksek lökosit ortalamasına sahip olan grup IBR+Parapox iken en düşük ortalamaya sahip olan grup kontrol grubudur ($p<0.001$). Son olarak zaman içerisinde grup değişimi de anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). Buna göre her 3 grupta da en düşük lökosit ortalaması başlangıç noktasında elde edilirken 30. gün lökosit ortalaması en yüksek seviyeye ulaşmıştır.



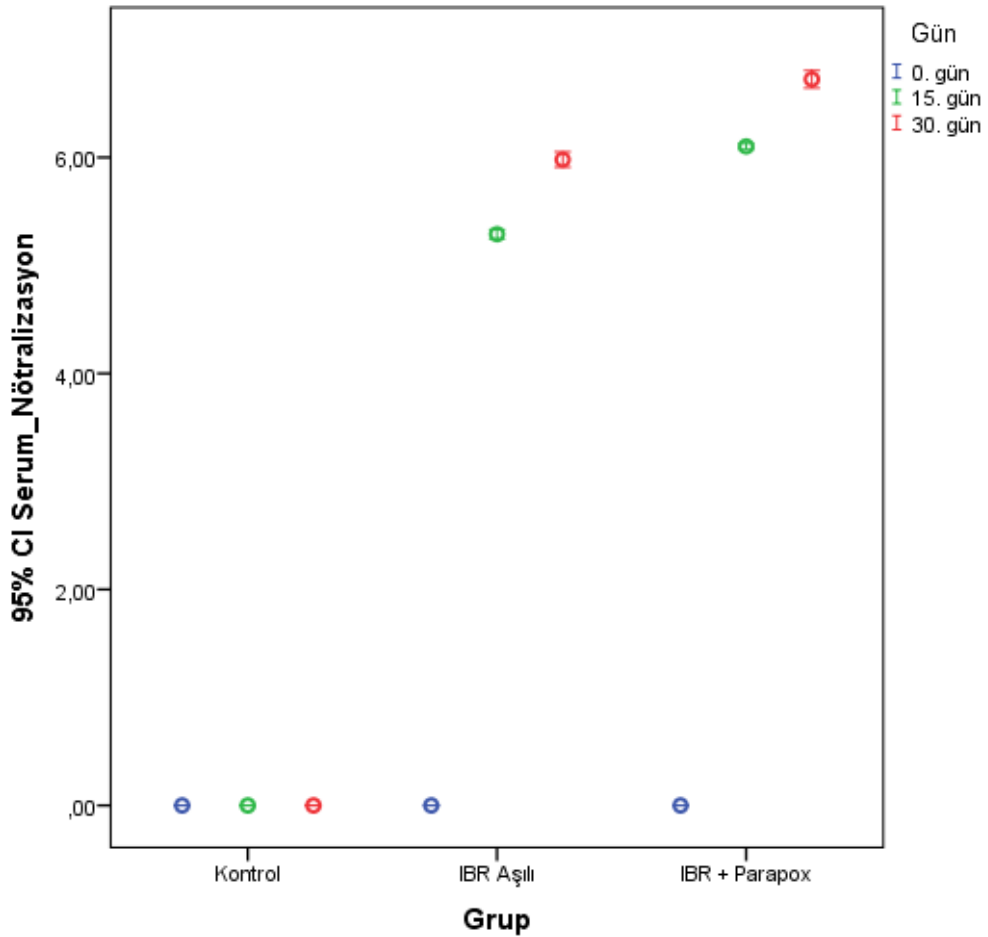
Şekil 7. Sığırlarda total lökosit değerleri (µl)

5.6. Sığırlarda Serum Nötralizasyon Testi Antikor Sonuçları

Tablo 4: Sığırlarda Antikor Titre Değerleri

Serum Nötralizasyon	Grup		
	Kontrol	IBR	IBR+Parapox
0. gün	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
15. gün	0.000±0.000	5.290±0.035	6.100±0.022
30.gün	0.000±0.000	5.980±0.057	6.720±0.065
Zaman değişimi için p değeri	<0.001		
Grup için p değeri	<0.001		
Zaman*grup değişimi için p değeri	<0.001		

Serum antikor değerleri için elde edilen tanımlayıcı istatistikler ve p değerleri Tablo 4’de verilmiştir. Buna göre zaman ilerledikçe serum antikor değerindeki değişim IBR ve IBR+Parapox grubunda artış göstermektedir. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). En yüksek serum nötralizasyon ortalamasına sahip olan grup IBR+Parapox grubudur ($p<0.001$). Kontrol grubuna göre hem IBR grubu hem de IBR+Parapox grubu ortalama olarak artış göstermiştir. Ek olarak zaman içerisinde grup değişimi de istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.001$). Başlangıç değerine göre 15. gün ve 30. gün serum antikor değişimi artış yönündedir. IBR ve IBR+Parapox grubu içerisinde 30.gün antikor ortalaması en yüksek seviyeye ulaşmıştır.



Şekil 8. Sığırlarda antikor titre değerleri

6. TARTIŞMA

Bağıışıklık sistemi, vücudu mikrobiyal enfeksiyonlara karşı savunarak homeostazın korunmasında yer alan karmaşık bir süreçler ağıdır. immünostimülanlar veya immüno-güçlendiriciler, immünolojik savunma mekanizmalarının spesifik veya spesifik olmayan stimülasyonuna yol açan tıbbi ajanlardır. İmmünostimülatörler olarak ta bilinen immünostimülanlar, hastalıkların önlenmesi ve çeşitli viral ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı vücudun doğal direncinin iyileştirilmesi için insan ve hayvanların bağıışıklık sistemini harekete geçiren etkili maddelerdendir. Spesifik olmayan ve antijene bağıımlı olmayan uyarıcılar, immünolojik hafıza hücrelerini etkilemez ve terapötik etkinlikleri nispeten hızlı bir şekilde azaldığından, aralıklarla veya sürekli olarak uygulanmaları gerekir. Biyolojik olarak aktif olan bu maddeler, doğal kaynaklardan elde edilen veya farklı kimyasal özellikler ve etki mekanizmaları ile sentetik olarak yapılan ürünlerdir. Genel olarak immünostimülanlar, enfeksiyon hastalıklarının tedavisi için spesifik antikörlerin ve sitokinlerin sentezini indükler (31).

Doğal bağıışıklık sisteminde önemli rol oynayan sitokinler şunlardır: TNF- α , IL-1, IL-10, IL-12, tip I interferonlar (IFN- α ve IFN- β), IFN- γ , ve kemokinler.

TNF- α ; Tümör nekroz faktör alfa esas olarak monosit ve makrofajlar tarafından sentezlenen ve belirli koşullarda T-lenfosit, nötrofil, mast hücresi, fibroblast ve endotel hücrelerinin de üretimine katkı sunduğı bir çeşit glikoproteindir. Doku hasarı ya da fiziksel stres sonrası kanda ilk saptanabilen sitokindir ve birçok otoimmün hastalıkta inflamasyonun başlamasında ve devam ettirilmesinde önemli özellikleri bulunmaktadır. Sentez ve salınımını başlatan çeşitli uyaran söz konusu olup, en başlıcası lipopolisakkaritlerdir. Özellikle gram-pozitif bakteri, parazit, virüs ve tümör hücreleri, immün kompleks oluşumu, kompleman sistemi aktivasyonu, interlökin (IL)-1, IL-2 ve interferon- γ ile artış sağlanmaktadır. Hatta kendisi ile dahi salınımı indüklenebilmektedir (75).

IL-1; İnterlökin-1, aktive makrofajlar tarafından üretilen diğeri bir enflamatuar sitokindir. Etkileri, TNF- α 'ya benzer ve aynı zamanda T hücrelerinin aktive edilmesine yardımcı olur.

IL-10; İnterlökin 10, aktive edilmiş makrofajlar ve Th2 hücreleri tarafından üretilir. Bu ağırlıklı olarak inhibitör bir sitokindir. IFN- γ 'nın Th1 hücreleri tarafından üretimini inhibe eder, böylece bağışık yanıtı Th2 tipe kaydırır. Aynı zamanda, aktive edilmiş makrofajlarda sitokin üretimini, sınıf II MHC ekspresyonunu ve makrofaj üzerindeki ko-stimulatör molekülleri inhibe eder, bu da immün yanıtta azalma ile sonuçlanır.

IL-12; İnterleukin 12 aktive edilmiş makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından üretilir. IFN- γ üretimini ve Th hücrelerin Th1 hücelere farklılaşmasını uyarmaktadır. Buna ek olarak, Tc ve NK hücrelerinin sitolitik fonksiyonlarını artırır.

INF- γ ; İnterferon gama, daha düşük ölçüde Tc ve NK hücreleri tarafından da üretilebilse de, asıl olarak Th1 hücreler tarafından üretilen önemli bir sitokindir. Hem doğal hem de adaptif bağışıklık sistemde çok sayıda fonksiyona sahiptir (76).

IL-8; Periferik kan mononükleer hücreleri, fibroblastlar, endotelial hücreler ve keratinositler tarafından sentezlenir. Yapımı IL-1 ve TNF tarafından uyarılmaktadır. İmmün cevapta inflamasyon bölgesine nötrofil kemotaksisine sebep olan en önemli mediatördür (77)

Öncelikle kimyasal olarak inaktive edilmiş PPVO'nun (iPPVO), paraimmünite olarak adlandırılan bir etki ile konakçıda immünmodülatör özellikler sergilediği görülmektedir. Daha sonrasında, iPPVO'nun immüностimülatör aktivitesi, farklı deney türlerinde ve klinik pratikte, farklı hayvan türlerinde farklı patojenlere karşı etkisi tespit edilmiştir. Mevcut bilgilere göre, bu etkiler potansiyel olarak kronik bulaşıcı hastalıklar, immünosüpresyon, patojen kalıcılığı ve hatta kansere bağlı olaylarda dahil olmak üzere çeşitli durumlarda profilaktik ve / veya terapötik araçlar olarak kullanılabilir. Bununla birlikte, immüностimülatör iPPVO etkilerinin arkasındaki biyolojik ve moleküler olaylar, tam olarak anlaşılamamıştır. iPPVO'nun doğal immünite üzerindeki ana etkileri, immün hücrelerin uyarılmasına ve IL-8, IL12 ve tip I interferonlar gibi sitokinlerin salgılanmasına bağlı görünmektedir. (78)

Virüsler, bağışıklık hücrelerini etkilemek için çeşitli stratejilerle, yani fonksiyonel etkisizleşmeye yol açan aşırı aktivasyonla, antijen sunumunu atlayarak veya efektör fonksiyonlarını baskılayarak, onlara karşı bağışıklık tepkisini manipüle edebilir (47). Poxvirus ailesinin Parapoxvirus cinsinin bir üyesi olan orf virüsü (ORFV), dünya genelinde koyun ve keçilerde yaygın bir patojen olarak bilinir. Bununla birlikte, etkisizleştirilmiş iPPVO, farklı türlerde veteriner hekimlikte terapötik immünmodülatörün yanı sıra önleyici olarak da kullanılmıştır (3). iPPVO, farelerde ve insan bağışıklık hücrelerinde sitokin salgılanması üzerinde güçlü etkilere neden olur; bu da enflamatuar ve Th1 ile ilişkili sitokinlerin otomatik olarak düzenlenmiş bir başlangıç düzenlenmesi döngüsüne ve ardından immünopatolojiyi azaltan Th2 ile ilişkili sitokinlerin oluşmasına neden olur (47). iPPVO enfeksiyonunun ardından, konakçının bağışıklık sistemi virusları yok etmeye yanıt verecek ve ilk adım olarak virüse karşı doğuştan gelen bir yanıt başlatacaktır (3). Bu, doğal immün sistemin çeşitli hücreleri tarafından kemokinlerin ve sitokinlerin uyarılmasını içerir. iPPVO enfeksiyonu, enfeksiyon bölgesinde doğal öldürücü (NK) hücreler, nötrofiller ve dendritik hücreler (DC'ler) birikimine yol açar. Buna ek olarak, iPPVO interferon-a (IFN-a), interlökin-1 β (IL1b), IL-8, granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) ve IFN salınımını uyarır (47).

Poxviridae familyası bilinen en büyük DNA virüslerini içerir. Kompleks genetik yapıları nedeniyle, poxvirüsler, konakçı immün tepkisini etkisizleştirebilen virülans proteinlerini kodlayan çeşitli genleri kullanarak immün evazyon için çeşitli mekanizmalara sahiptir. Aksi takdirde zayıflatılmış poxvirüsler, immünojenik özelliklere sahiptir ve muhtemelen makropinositozla hücrel olarak alımını kolaylaştırması nedeniyle, güçlü doğuştan gelen konak immün tepkisini indükler (79).

PPVO için bir dizi etkili immün kaçış mekanizması olduğu ileri sürülmüştür (47). Diğer virüsler gibi, PPVO da doğal bağışıklık sistemini uyarır. PPVO; fagositozu, NK hücre aktivitesi ve IFN-a, TNFa, IL-2 ve granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) salınımını uyarır. PPVO'nun, immün modüle edici fonksiyonlara sahip gen ürünlerinden olan; IL-10'un virüs ortholog

genini (80) ve interferon-direnç faktörünü kodlayan vaccinia E3L geni taşıdığı bildirilmiştir (81). Son zamanlarda, GM-CSF ve IL-2'yi bağlayan ve inhibe eden proteinler tanımlanmıştır (82). İmmün kaçış mekanizmaları ve immün uyarıcı aktivitenin kombinasyonu, PPVO için çok etkili bir hayatta kalma stratejisidir (47).

PPVO, atlarda, sığırlarda, kedilerde, köpeklerde ve domuzlarda nonspesifik immün sistemi stimüle ederek enfeksiyon ve stres kaynaklı hastalıkların önlenmesine yardımcı olan liyofilize bir enjeksiyon çözeltisidir. Bununla birlikte, literatür taraması, birçok hayvan türünde birçok enfeksiyonun tedavisinde önerilmiş olan iPPVO'nun, inaktif aşılarda aşılamalarda kullanımı ve aşılamayla birlikte bağışıklık sisteminin ilk tepki araçları olan sitokin sentezi üzerindeki etkileriyle ilgili bir araştırma olmadığını göstermiştir (41, 47).

iPPVO ile immünomodülasyonu anlamadaki bir diğer önemli husus, immünomodülatör etkilere neyin sebep olduğu sorusu veya başka bir deyişle aktif bileşen (ler) in araştırılması ile ilgilidir. Poxvirüsler, virüs kaynaklı birçok proteine sahip çok karmaşık parçacıkların yanı sıra immünomodülatör etkilerde rol oynayan hücresel materyallerdir. Ek olarak, viral nükleik asit veya inaktive PPVO üretim şekline bağlı olarak, "şartlandırılmış" ve enfekte olmuş doku kültüründen elde edilen süpernatant solüsyon tanımlanmış bağışıklık tepkilerini indükleyebilir (79).

Orf hastalığı olarakta bilinen bulaşıcı ektima hastalığı etkeni, Poxviridae ailesi, Parapoxvirus cinsinden Parapoxvirus ovis'tir. Bu çalışmada parapoxvirus ovis'in (E(P)CK₂₃) aşısı suşu kullanılmıştır. Bu etkenin in vitro üretiminde Ivanov ve arkadaşları (2016), kuzu böbrek, kuzu testis, kuzu kas, kuzu timüs gibi çeşitli primer hücre kültürleri ve embriyonal sığır böbrek hücresi (EBTR), Madin sığır böbrek hücresi (MDBK) gibi hücre hatlarını kullanmışlardır. Bu tez çalışması kapsamında da Parapoxvirus ovis üretiminin optimum şartlarının sağlanması amacıyla sığır ve kuzu orijinli böbrek hücre kültürleri kullanılmış ve en ideal hücre kültürünün MDBK olduğu belirlenmiştir.

Hücre kültürlerinde görülen CPE düzeylerinin sığır böbrek hücrelerinde inokulasyonunu takip eden 24. saatte görülmeye başlanmış (yaklaşık %10-20) ve 5. günde %80-90'larda yeterli sitopatojenik etkiler görüldüğünden virüsler dondurulup toplanmıştır. Kuzu böbrek hücreleri ile karşılaştırıldığında sığır böbrek hücre kültürlerinin virüs üretimi için daha ideal sonuçlar verdiği (sığır böbrek hücre kültüründe 10^6 /ml, kuzu böbrek hücre kültüründe $10^{5.2}$ /ml) belirlendiğinden çalışma MDBK hücre kültürleri esas alınarak tamamlanmıştır. Gülyaz ve ark.(79)'ları kuzu ve oğlaklarda yaygın bir viral enfeksiyon olan bulaşıcı ektima ile ilgili yaptıkları bir çalışmada virusun sığır böbrek hücre kültürlerinde adaptasyon, üretim ve raf ömrü gibi parametrelerini belirlemişlerdir. Çalışmada adı geçen virusun enfektif titresinin $10^{6.5}$ /ml olarak belirlendiği tespit edilmiştir. Tarafımızdan yapılan bu çalışmada ise bulunan 10^6 /ml değeri yukarıdaki araştırmacıların sığır böbrek hücre kültür sonuçları uyumlu bulunduğu görülmektedir.

Elde edilen Parapoxvirus ovis antijenleri BEI ile inaktive edilmiş ve kontrolleri için MDBK hücre kültüründe 3 kör pasaj uygulaması ile doğrulaması yapılmıştır. Bu amaç için inaktive virüsler MDBK hücre kültürüne inoküle edilmiş ve 3 gün boyunca sitopatojenik etkilerine bakılmıştır. Hücre kültürlerinde herhangi bir CPE görülmediği tespit edildiğinden virüslerin inaktive oldukları kabul edilmiş ve çalışmalara inaktif virüsler ile devam edilmiştir. Virüs inaktivasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda (70, 71) benzer yöntemlerin kullanıldığı ve BEI ile inaktive işlemlerinin rutin olarak uygulandığı görülmektedir. Tarafımızdan yapılan bu çalışmada elde ettiğimiz virüslerin literatürde belirtilen yöntemler ile uyumlu bir şekilde inaktivasyon işlemlerinin yapıldığı ve yapılan kontrol çalışmalarında canlı virüslere rastlanılmadığı belirlenmiştir.

Enfeksiyonlara karşı doğal immun yanıt (doğal bağışıklık) hastalıklarla mücadelede oldukça önemli rol oynamaktadır. Bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerinden dolayı düzenleyici özelliklere sahip olan maddelere immunmodülatörler denir.

Genellikle bağışıklık yanıtını artırmak veya düzenlemek için kullanılan bu terimin eşanlamlısı immunostimulan maddeler olarak da adlandırılabilir. Yapılan çalışmalarda inaktive edilmiş Parapoxvirusların özellikle enfeksiyöz hastalıklara karşı nonspesifik olarak doğal bir immunomodulator olabileceği çok sayıda araştırmada gösterilmiştir.

Bu çalışmada da inaktive edilmiş parapoxvirusların immunomodulator etkileri farelerde TNF α , IL-6, IL-8, IL-12 ve IL-1 β gibi sitokinlerin düzeylerinin belirlenmesi ile ortaya konulmaya çalışılmıştır.

İmmunomodulatorler bağışıklık sistemini uyarmak veya düzenlemek amacıyla kullanılan bileşiklere verilen isimdir. İnaktif Parapoxvirus ovis spesifik olmayan bağışıklık sistemini uyararak hayvanlarda viral veya stres kaynaklı hastalıkların önlenmesine veya tedavisine yardımcı olmaktadır (42, 84, 85, 86).

Enfeksiyonlara karşı doğal immün yanıt (nonspesifik, doğal bağışıklık), hastalıklarla mücadelede önemli bir rol oynar. Bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerinden dolayı düzenleyici özelliklere sahip olan maddelere “İmmunomodulatorler” denir. İmmunomodulatorler, genellikle bağışıklık yanıtını arttırmak veya düzenlemek için kullanılan maddelerdir. İmmunomodulatorler için diğer eşanlamlı ifadeler ise immünostimulanlar veya immünopotansiyatörler gibi terimleridir (85).

Bu immünomodulatorlerden biri olan inaktif parapoxvirus ovis (iPPVO) (Zylexis®), immün sistemi uyararak özellikle enfeksiyöz hastalıklara karşı koruyucu olarak kullanılan nonspesifik bir immunomodulator olup enfeksiyöz viral hastalıklara karşı doğal bağışıklığı (non-spesifik, innate bağışıklık) stimüle eden güçlü bir mikrobiyolojik kökenli immunostimulandır (84). iPPVO’nun farelerde herpes simplex ve hepatitis B virusuna karşı sitokin (IFN- γ , IL-12p40, IL-18 ve TNF- α) indüksiyonunu aktive ederek bu virüslere karşı duyarlılığı azalttığı ve antiviral aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (47).

Yapılan bir çalışmada IBR’ li sığırlara iPPVO verildiğinde IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-12 düzeylerinde artış olduğunu ve sonuçta iPPVO’nun immunomodulator etkisinin olduğunu bildirmişlerdir (87).

Avcı ve ark.(88)'lerinin yaptığı çalışmada ratlara iPPVO (1 ml/rat) uygulanmış, uygulamadan sonra 1. 2. 4. 8. 12. 16. ve 24. saatlerde serum örnekleri almışlardır. ELISA' da yaptıkları analizler sonucunda TNF- α (16. ve 24. saat) ve IL-6 (12. 16. ve 24. saat) seviyelerinde artış olduğunu, IL-10 ve IL-12 miktarlarında ise dalgalanmalar olduğunu bildirmişlerdir. Sonuçta sitokin seviyelerindeki artışların iPPVO' nun immunomodulator etkilerinden ileri gelebileceğini, ancak iPPVO'un bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerini tam olarak anlamak için ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç olduğunu bildirmişlerdir.

Hue ve ark.(89)'ları atlarda EHV enfeksiyonlarında iPPVO verildiğinde IFN- α , IFN- β ve IFN- γ genlerinde daha erken ve güçlü bir artış olduğunu, bununda iPPVO'nun EHV enfeksiyonlarına karşı bağışıklık tepkisini güçlendirdiğini bildirmişlerdir.

Ulgen ve ark (90)'larının yaptığı bir çalışmada atlara 2 ml kasiçi iPPVO vermişler ve 0., 1., 3., ve 5. günde kan almışlar. Kanda iPPVO uygulanan hayvanlarda polymorfnuclear lökositlerin fagositik, hücre içi öldürme (intracellular killing activity) ve MPO (myeloperoxidase) aktivitelerinde önemli düzeyde artışlara neden olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan bir araştırmada, iPPVO'nun etkinliği at herpes virüsü tip 1 (EHV-1) ve S. equi ile enfekte edilen atlarda araştırılmıştır. Çalışma sonucunda hem EHV-1 hemde S. equi ile enfekte atlarda klinik belirtilerin 11. ve 28. günlerde yapılan muayenelerde klinik semtomların çok azaldığını, pozitif virus taşıyan hayvan sayılarının çok düşük olduğunu, iPPVO'nun güvenli olduğunu ve EHV-1 ve S. Equi enfeksiyonlarında faydalı olduğunu bildirmişlerdir (91).

Arai ve ark (92)'lerinin sıçanlarda yaptıkları çalışmada, iPPVO uygulamasından sonra, deney grubundaki hayvanlarda IFN- γ ve IL-10 ekspresyonlarının indüklendiğini bildirilmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada, iPPVO uygulanmış farelerin serumlarında 6 ve 12 saat sonra IFN-1 15 misli artarken, uygulamadan 24 ve 48. saat sonra IFN- γ 15 misli ve IL-12 6 misli 72 ve 96. saatlerde IL-10'un 4,7 kat, IL-4'ün 4,9 kat artış gösterdiği saptanmıştır (58).

Schütze ve ark (84)'larının köpeklerde yaptıkları bir çalışmada da, iPPVO uygulandıktan sonra lökositlerde, monositlerde, polimorfonükleer hücrelerde ve fagositotik aktivitede belirgin bir artış olduğunu bildirmişlerdir.

Bir çalışmada da insanlarda iPPVO'nun, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-8 IL-12 IL-18 in salgılanmasını artırıcı yönde etki oluşturduğunu bildirmiştir (41).

Pavan ve ark (93)' larının gümüş yayın balıklarında yaptıkları bir çalışmada iPPVO'nun granülosit ve trombosit sayısında artışlara ve sonuçta immunomodulator etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

McKeever ve ark (94)'ları Orf ile deneysel enfekte ettikleri kuzularda ELISA yöntemi ile 40 gün boyunca izledikleri serum antikor titrelerinin, 5. günden itibaren yükselmeye başladığını 10-20. günlerde pik yaptığını, 20. günden sonra düşüşe geçtiğini ve 40 gün sonra düşük seviyelere indiğini belirtmişlerdir.

Bu araştırmada sığır ve farelere yapılan uygulama sonucu elde edilen serum ve doku örneklerin de total lökosit, serum BHV-1 antikor seviyesi, ELISA yöntemi ile IL-1 β , IL-12, IFN- γ , TNF- α ve IL-10 seviyelerinde, Real-Time PCR yöntemi ile dalakta sitokinler (IL-1 β , IFN- γ , TNF- α) araştırılmıştır. Yukarıda belirtilen testlerden elde edilen bulgular aşı grubundaki değerler kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı olacak şekilde yüksek tespit edilmiştir. Bu çalışmada bulunan bulgular yukarıda belirtilen literatür bulguları ile uyumlu olduğu görülmüştür. Bu bulgulara göre iki doz attenuue aşı hayvanlarda önemli düzeyde immün yanıt oluşturduğu kanaatine varılmıştır.

iPPVO'nun aynı zamanda, çeşitli türlerde baskın bir Th1 tipi immün tepkiye yol açtığı bildirilmektedir. Bu hipotez, iPPVO'nun in vitro ve ayrıca in vivo immünmodulator aktiviteyi indüklemeye kabiliyetine sahip olmasıyla açıklanabilir. Yapılan bu çalışmada da, IBR aşısı ve iPPVO'nun yapıldığı gruptaki hayvanlarda lenfositlerdeki artış bu hipotezi doğrular niteliktedir (3)

iPPVO immün uyarıcı özellikleri uzun zamandır in vivo ve in vitro olarak gösterilmiştir, ancak içerdiği biyolojik ve moleküler mekanizmalar büyük  l de bilinmemektedir. Anzilio ve ark. (58)'larının yapmış olduğu çalışmada, iPPVO uygulanmış farelerin serumlarında 6 ve 12 saat sonra, interferon I (IFN-I), 15 misli artarken, uygulamadan 24 ve 48.saat sonra IFN gamma 15 misli ve IL-12, 6 misli artış göstermiştir. Yapılan bu çalışmada ise deneme grubunda 102. saatte IFN gamma, kontrol -1 grubuna göre yaklaşık 3 kat, kontrol-2 grubuna göre yaklaşık 6 kat artarken IL 12, 2 kat artmıştır.

 alışmalar arasındaki bu farklılıkların kullanılan hayvan türü ve metod farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Yapılan bu  alışmamada da, iPPVO uygulanan kontrol 1 ve deneme grubunda bazı sitokin düzeylerinde (IFN gamma ve IL 2, IL 6, IL 12) artış belirlenmiştir.

7.SONUÇ

Sürü sağlığı ve korumaya yardımcı immunmodölatör etkili ajanlardan biri olan inaktif parapoxvirus ovis (iPPVO)'un, sığırlarda inaktif IBR aşısı uygulaması programında tatbikinin, serum antikor titrelerinde ve sitokin konsantrasyonlarında değişikliklere neden olabileceği hipotezine dayanan bu çalışmada, iPPVO'un inaktif IBR aşısı uygulamasında antikor titreleri, proinflatuar ve anti-inflatuar sitokin konsantrasyonlarındaki değişiklikler bu çalışmada ortaya konarak literatüre önemli katkı sağlanmıştır. Bu nedenle, IBR aşısı uygulamalarında, diğer aşılama programlarında ve koruyucu hekimlikte iPPVO'un kullanımının yaygınlaştırılmasının hayvan sağlığı yönünden faydalı olacağı kanaatindeyiz.

8.KAYNAKLAR

1. Bukar AM, Jesse FFA, Che CA, et al. Immunomodulatory strategies for parapoxvirus: Current status and future approaches for the development of vaccines against orf virus infection. *Vaccines (Basel)* 2021; 9, 11: 1341
2. Khoo, CK, Norlina D, Roshaslinda D, et al. Molecular diagnosis of caprine ORF virus (ORFV) from penang, Malaysia. *Malaysian J Vet Research* 2019; 10: 98–102.
3. Weber O, Mercer A, Friebe AA, Knolle PA, Volk HD. Therapeutic immunomodulation using a virus the potential of inactivated orf virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32: 451–460.
4. Haig DM, Fleming S. Immunomodulation by virulence proteins of the parapoxvirus orf virus. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 72: 81–86.
5. Haig DM. Subversion and piracy: DNA viruses and immune evasion. *Res Vet Sci* 2001; 70: 205–219.
6. Haig DM, Thomson J, McInnes C, et al. Orf virus immuno-modulation and the host immune response. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 87: 395–399.
7. McInnes CJ, Wood AR, Mercer AA. Orf virus encodes a homolog of the vaccinia virus interferon-resistance gene E3L. *Virus Genes* 1998; 17: 107–115.
8. Lear A, Hutchison G, Reid HW, Norval M, Haig DM. Phenotypic characterisation of the dendritic cell accumulating in ovine dermis following primary and secondary orf virus infections. *Eur J Dermatol* 1996 ; 6: 135-140.
9. Haig D, McInnes C, Deane D, et al. Cytokines and their inhibitors in orf virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 1996; 54: 261–267.
10. Haig D, Deane D, Percival A, et al. The cytokine response of afferent lymph following orf virus reinfection of sheep. *Vet Dermatol* 1996; 7: 11–20.
11. Büttner M, Czerny CP, Lehner KH, Wertz K. Interferon induction in peripheral blood mononuclear leukocytes of man and farm animals by poxvirus vector candidates and some poxvirus constructs. *Vet Immunol Immunopathol* 1995; 46: 237–250.

12. Mayr A, Rüttig H, Stickl H, Alexander M. Paramunität, Paramunisierung, Paramunitätsinducer. Teil 1. Geschichtliche Entwicklung, Begriffsbestimmung und Wesen. Fortschr Med 1979; 97: 1205-1210.
13. Mayr A, Büttner M, Wolf G, Meyer H, Czerny C. Experimental detection of the paraspecific effects of purified and inactivated poxviruses. Zentralbl Veterinarmed B 1989; 36: 81-99.
14. Friebe A, Friederichs S, Scholz K, et al. Characterization of immunostimulatory components of orf virus (parapoxvirus ovis). J Gen Virol 2011; 92: 1571–1584.
15. Porth CM. Essentials of Pathophysiology: Concepts of Altered Health States. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2004: 134-149.
16. Chinen J, Finkelman F, Shearer WT. Advances in basic and clinical immunology. J Allergy Clin Immunol 2006; 118: 489-495.
17. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Temel İmmunoloji. CamcıoğluY, Deniz G (Çeviri Editörleri).4. Baskı, Ankara: Güneş, 2015.
18. Litman G, Cannon J, Dishaw L. Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. Nat Rev Immunol 2005; 5: 866-879.
19. Agerberth B, Gudmundsson G. Host antimicrobial defence peptides in human disease. Curr Top Microbiol Immunol 2006; 306: 67-90.
20. Diker KS. İmmunoloji. 2. Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara 2005: 1-26.
21. McHeyzer-Williams LJ, Malherbe LP, McHeyzer-Williams MG. Helper T cell-regulated B cell immunity. Curr Top Microbiol Immunol 2006; 311: 59-83.
22. Arda M. Temel Mikrobiyoloji. 4. Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara 2000: 107- 110.
23. Baker CJ, Edwards MS. Group B streptococcal infections. In: Remington JS, Klein JO (Editors). Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant. 4th Edition, Philadelphia: Saunders; 1995: 980-1064.
24. Demirbakan H, Kayar B. İmmunolojiye giriş, immunitede yer alan organ ve hücreler. Sağlık Bilimlerinde Klinik Mikrobiyoloji, Akademisyen Yayınevi, 2022: 235-247.

25. Douglas R. McDonald, Ofer Levy. Clinical Immunology Principles and Practice (Fifth Edition), 2019.
26. Songu M, Katılmış H. Enfeksiyondan korunma ve immun sistem. J Med Updates 2012: 31-42.
27. Rathee P, Chaudhary H, Rathee S, Rathee D, Kumar V. Immunosuppressants: A review. The Pharma Innovation Journal 2013: 90-101.
28. Hussain Y, Khan H. Immunosuppressive Drugs. Encyclopedia Infection and Immunity 4, 20022: 726-740.
29. Suthanthiran M, Morris RE, Strom TB. Immunosuppressants: cellular and molecular mechanisms of action. Am J Kidney Dis 1996; 28,2: 159-172.
30. Labh SN, Shakya SR. Application of immunostimulants as an alternative to vaccines for health management in aquaculture. Int J Fish Aquat St 2014: 153-156.
31. Shahbazi S, Bolhassani A. Immunostimulants: Types and Functions. J Med Microbiol Infec Dis 2016, 4 (3-4): 45-51.
32. Galeotti M. Some aspects of the application of immunostimulants and a critical review of methods for their evaluation. J Appl Ichthyol 2007; 14 (3-4): 189-199.
33. Patil US, Jaydeokar AV, Bandawane DD. Immunomodulators: A pharmacological review. Int J Pharm Pharm Sci 2012: 30-36.
34. Biswajit D, Suvakanta D, Chandra CR, Jashabir C. An overview of levamisole hydrochloride with immunostimulant activity. Am J Pharm Health Res 2014: 1-9.
35. Tsuruo T, Naganuma K, Lida H, Yamori T, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Inhibition of lymph node metastasis of P388 leukemia by bestatin in mice. J Antibiot (Tokyo) 1981: 1206-1209.
36. Munangandu HM, Salinas I, Dalmo RA. Editorial: Vaccines and immunostimulants for finfish. Front Immunol 2020; 11: 573771.
37. Sirko A, Vanek T, Gora-Sochacka A, Redkiewicz P. Recombinant cytokines from plants. Int J Mol Sci 2011; 11: 3536-3552.
38. Fujii SI, Lotze MT. Interleukin-10 (IL-10). In cytokines in the genesis and treatment of cancer, Humana Press 2007: 165-79.

39. Madrigal-Bujaidar E, Morales-González JA, Sánchez-Gutiérrez M, et al. Prevention of aflatoxin B1-induced DNA breaks by β -D-glucan. *Toxins* (Basel) 2015; 7: 2145-2158.
40. Weber O, Knolle P, Volk HD. Immunomodulation by inactivated Orf virus (ORFV) therapeutic potential. *Birkhäuser Advances in Infectious Diseases* 2007; 297–310.
41. Friebe A., Siegling A., Friederichs S., Volk H.D., Weber O. Immunomodulatory effects of inactivated parapoxvirus ovis (ORF virus) on human peripheral immune cells: induction of cytokine secretion in monocytes and Th1-like cells. *J Virol* 2004; 78: 9400-9411.
42. Schütze N, Raue R, Büttner M, Alber G. Inactivated parapoxvirus ovis activates canine blood phagocytes and T lymphocytes. *Vet Microbiol* 2009; 137: 260–267.
43. Guzik TJ, Korbut R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54: 469-487.
44. Varki NM, Varki A. Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab Invest* 2007; 87: 851-857.
45. Varki A. Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med* 2008; 14: 351-360.
46. Rush BR, Flaminio MJ. Immunomodulation in horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 2000; 16: 183–197.
47. Weber O, Siegling A, Friebe A, et al. Inactivated parapoxvirus ovis (Orf virus) has antiviral activity against hepatitis B virus and herpes simplex virus. *J Gen Virol* 2003; 84: 1843- 1852.
48. Robinson AJ, Lyttle DJ. Parapoxviruses: their biology and potential as recombinant vaccines. In: M Binns, GL Smith (eds): *Recombinant poxviruses*. CRC Press, Boca Raton 1992; 285–327.
49. Haig DM. Orf virus infection and host immunity. *Curr Opin Infect Dis* 2006; 19: 127-131.
50. Andrewes C, Pereira (eds). *Viruses of vertebrates*. Baillière, Tindall, Cassell, 1964, London.

51. Fauquet CM, Mayo, MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds). Virus Taxonomy. Eighth report of the International committee on taxonomy of viruses. Academic Press, Elsevier, London, 2005; 117–133
52. Buttner M, Rziha HJ. Parapoxviruses: From the lesion to the viral genome. *J Vet Med B* 2002; 49: 7-16.
53. Becher P, König M, Müller G, Siebert U, Thiel HJ. Characterization of sealpox virus, a separate member of the parapoxviruses. *Arch Virol* 2002; 147: 1133–1140.
54. Hiramatsu Y, Uno F, Yoshida M, Hatano Y, Nii S. Poxvirus virions: their surface ultrastructure and interaction with the surface membrane of host cells. *J Electron Microsc (Tokyo)* 1999; 48: 937–946.
55. Esposito JJ, Fenner F: Poxviruses. In *Fields virology* 4th edition. Edited by: Fields, BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE. Philadelphia, Pa: Lippincott, Williams and Wilkins; 2001; 2885-2921.
56. Marrack P, Kappler J. Subversion of the immune system by pathogens. *Cell* 1994; 28: 323-332.
57. Martins M, Rodrigues F.S, Joshi LR, Jardim JC, et al. Orf virus ORFV112, ORFV117 and ORFV127 contribute to ORFV IA82 virulence in sheep. *Vet Microbiol* 2021; 257:109066.
58. Anziliero D, Weiblen R, Kreutz LC, Spilki F, Flores EF. Inactivated Parapoxvirus ovis induces a transient increase in the expression of proinflammatory, Th1-related, and autoregulatory cytokines in mice. *Braz J Med Biol Res* 2014; 47: 110-118.
59. Upton C, Mossman K, McFadden G. The myxoma virus-soluble interferon-gamma receptor homolog, M-T7, inhibits interferon-gamma in a species-specific manner. *J Biol Chem* 1995; 17, 270: 3031-3038.
60. Tzahar E, Moyer JD, Waterman H, et al. Pathogenic poxviruses reveal viral strategies to exploit the ErbB signaling network. *EMBO J* 1998; 17: 5948–5963.
61. Jenkinson DM, Hutchison G, Reid HW. The B and T cell responses to orf virus infection of ovine skin. *Vet Dermatol* 1992; 3: 57-64.

62. Sayers RG. Associations between exposure to bovine herpesvirus 1 (BoHV1) and milk production reproductive performance, and mortality in Irish dairy herds. *J Vet Med Sci* 2017; 100: 1340-1352.
63. Scott P. Reviewed by Dr Rachael Tarlinton. Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR, BHV 1). *Anim Health Res Rev* 2017; 6; 63–74.
64. Ackermann M, Müller HK, Bruckner L, Kimh U. Eradication of infections bovine rhinotracheitis in Switzerland: review and prospect. *Vet Microbiol* 1990; 23: 365-370.
65. Fraser CM. The Merck Veterinary Manual. 6th edition, Merck and Co Inc Rahway, NJ, USA 1986; 711-712.
66. Vargas-Nino A, Vargas J, Martin JAP, Vasquez MC. Estado serologico para IBR, DVB, leucosis, leptospira y Neospora caninum en hembras bovinas del Departamento de Santander, Colombia. *Rev MVZ Cordoba* 2018; 2: 6671-6680.
67. Yıldırım Y, Yılmaz V, Majarashın ARF. Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi illerinde bulunan sığırlarda viral solunum sistemi enfeksiyonlarının seroprevalansı. *Kafkas Univ Vet fak Derg* 2009; 15:601-606.
68. Alkan F, Bilge-Dagalp S, Karapınar Z, Timurkan MO, Coskun N, Burgu I. Long-term study on the vaccination with BoHV-1 glycoprotein Edeleted marker vaccine in selected two dairy herds in Turkey. *Trop Anim Health Prod* 2018; 50:353-363.
69. Freshney RI. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications. 2010; 6th Edition, John Wiley & Sons Ltd., Hoboken.
70. Yanbakan S. Konya bölgesindeki sığırlarda bovine herpesvirus-1 (BHV-1) enfeksiyonunun nötralizasyon testi ve enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ile karşılaştırmalı olarak araştırılması. *Konya Vet Fak Derg* 2004;32: 56-62.
71. Bachrach HL, Callis JJ, Hess WR, Patty RE. A plaque assay for foot-and-mouth disease virus and kinetics of virus reproduction. *Virology* 1957; 4: 224–236.

72. Adams GDJ, Cook I, Ward KR. The principles of freeze-drying. Wolkers WF, Oldenhof H. eds. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Springer, New York. 2015: 121-143.
73. Natt MP, Herrick CA. A New blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. Poultry Science 1952; 4: 735-738.
74. Frey HR. Vermehrungskinetik and verwendbarkeit eines stark zytopatogenen VD-MD Virusus Ziehl Exp. Pyschol 1971; 3: 239-47Gülyaz V, Saraç F, Hasöksüz M, Serdar UZ. The use of rabbits in studies of immunity and safety of Contagious Ecthyma (CE) vaccine. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2020; 1;31(1):75-81.
75. Çayakar A. Nedir Bu Tümör Nekrozis Faktör Alfa. Türkiye Klinikleri J Intern Med. 2018;3(2):67-76.
76. <http://microbiologybook.org/Turkish-immunol/immunolchapter13turk.htm>
77. Sarnanta KA, Oppenheim JJ, Matsushima K. Interleukin-8 (Monocyt derivated neutrophil chemotactic factor) dynamicaly regulates it's own receptˆr expression on human neutrophil. Biol Chemistry 1990; 265:187-9.
78. Adams AA, Horohov DW. The Effect of an Immunomodulator (parapoxvirus ovis) on Cell-Mediated Immunity (CMI) in Abruptly Weaned Foals. Vet. Immunol. Immunopatho 2013; 153(1): 118-122. 37
79. Castrucci G, Osburn BI, Frigeri F, Ferrari M, Salvatori D, Dico ML, Barreca F. The use of immunomodulators in the control of infectious bovine rhinotracheitis. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 2000; 1;23(3):163-73.
80. Fleming SB, McCaughan CA, Andrews AE, Nash AD, Mercer AA. A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus orf virus. J Virol 1997; 71, 4857- 4861.
81. Haig, DM, McInnes CJ, Thomson J, Wood A, Bunyan K, Mercer AA. The orf virus OV20.0L gene product is involved in interferon resistance and inhibits an interferon-inducible, double stranded RNA-dependent kinase. J. Immunol 1998; 93, 335-340.

82. Deane D, McInnes CJ, Percival A. Orf virus encodes a novel secreted protein inhibitor of granulocytemacrophage colony-stimulating factor and interleukin-2. *J Virol* 2000; 74, 1313-1320
83. Gülyaz V, Saraç F, Hasöksüz M, Serdar UZ. The use of rabbits in studies of immunity and safety of Contagious Ecthyma (CE) vaccine. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* 2020;1;31(1):75-81.
84. Schütze N, Raue R, Buttner M, Alber G. Inactivated parapoxvirus ovis activates canine blood phagocytes and T lymphocytes. *Vet Microbio* 2009; 137: 260–267.
85. Blecha F. Immunomodulation: a means of disease prevention in stressed livestock. *J Anim Sic* 1988; 66: 2084-2090.
86. Paillot R. A systematic review of the immune-modulators Parapoxvirus ovis and Propionibacterium acnes for the prevention of respiratory disease and other infections in the horse. *Vet İmmun İmmunopath* 2013; 153:1-9.
87. Erbasan S. İnaktif Parapoxvirus (iPPVO)’ un, sığırlarda infectious bovine rhinotracheitis (IBR) aşısı uygulamasına immunomodülatör etkisinin araştırılması. Doktora Tezi, Burdur: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2019.
88. Avcı O, Bulut O, Dik O. Effects of inactive parapoxvirus ovis on cytokine levels in rats. *J Vet Med Sci* 2016; 1: 129-131.
89. Hue ES, Richard EA, Fortier C, et al. Equine PBMC cytokines profile after In Vitro α - and γ -EHV Infection: Efficacy of a Parapoxvirus Ovis Based-Immunomodulator Treatment. *Vaccines (Basel)* 2017; 5: 1-17.
90. Ulgen S, Yaramış CP, Rayaman E, Gurer US, Or ME, Sehirli AO. Effects of inactivated Parapoxvirus ovis on polymorphonuclear leukocyte function and myeloperoxidase activity in horses. *Vet Med* 2014; 12: 631-636
91. Ons E, Brussel LV, Lane S, et al. Efficacy of a Parapoxvirus ovis-based immunomodulator against equine herpesvirus type 1 and Streptococcus equi infections in horses. *Vet Microbiol* 2014; 10: 232-240.
92. Arai KI, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem* 1990;59: 783-836.

93. Pavan TR, Nied CO, Noro M, et al. Inactivated Parapoxvirus ovis as inducer of immunity in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *An Acad Bras Cienc* 2016; 3:1451-1457.
94. McKeever DJ, Reid HW, Inglis NF, Herring AJ. A qualitative and quantitative assessment of the humoral antibody response of the sheep to orf virus infection. *Vet Microbiol* 1987; 15: 229-241.

