

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI



Neonatal Buzağı İshallerinde Serum
Sitokin Profili ile D Vitamini
Arasındaki İlişkinin Araştırılması

DOKTORA TEZİ

Mehmet ÇALIŞKAN

2021

ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

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

Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri



ETİK BEYAN

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.

Adı Soyadı: Mehmet ÇALIŞKAN

Tarih:

İmza:

ELAZIĞ

TEŞEKKÜR

Bu çalışmamda beni değerli katkılarıyla yönlendiren ve yardımlarını esirgemeyen doktora tez danışmanım Prof. Dr. Murat DABAK'a, doktora çalışmam süresince katkılarından dolayı İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Engin BALIKCI, Prof. Dr. Ömer KIZIL, Prof. Dr. Tolga KARAPINAR ve Prof. Dr. Mustafa İSSİ'ye; yine bu çalışmamı gerçekleştirmemde yardımları bulunan mesai arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Kenan Çağrı TÜMER'e ve Arş. Gör. Sümeyye BABACAN'a, istatistiksel analizlerin yapılmasındaki katkılarından dolayı Prof. Dr. Cemal ORHAN'a ve çalışmaya desteklerinden dolayı FÜBAP koordinatörlüğüne teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	I
ETİK BEYAN	II
TEŞEKKÜR	III
TABLolar LİSTESİ	VII
ŞEKİLLER LİSTESİ	VIII
KISALTMALAR LİSTESİ	IX
1.ÖZET	XII
2. ABSTRACT	XV
3. GİRİŞ	1
3.1. İmmün Sistem	2
3.1.1. Doğal İmmün Sistem	2
3.1.2. Kazanılmış İmmün Sistem	3
3.1.3. Sitokinler	8
3.1.4. Neonatal Buzağılarda İmmün Sistem	11
3.2. D Vitamini	16
3.2.1. D Vitamini Bağlayıcı Protein	19
3.2.2. D Vitamini Reseptörü	20
3.2.3. D Vitamininin İnaktivasyonu	20
3.2.4. D Vitamininin Mineral Metabolizmasındaki Klasik Fonksiyonları	21
3.2.5. D Vitamininin Non-Klasik Fonksiyonları	22
3.2.5.1. D Vitamini ve İmmün Sistem	24
3.2.5.1.1. D Vitamininin Doğal Bağışıklıktaki Rolü	26
3.2.5.1.2. D Vitamininin Kazanılmış Bağışıklıktaki Rolü	29
3.2.5.1.3. D Vitamini ve İntestinal İmmünite	31

3.2.5.1.4. D Vitamini ve Enfeksiyöz Hastalıklar	31
3.2.5.1.5. Organizmanın D Vitamini Durumunun Değerlendirilmesi	32
3.3. Neonatal Buzağı İshalleri	33
3.3.1. E. coli İshalleri	34
3.3.1.1. E. coli Enfeksiyonlarında İmmün Yanıt	36
3.3.2. Rotavirüs İshalleri	37
3.3.2.1. Rotavirüs Enfeksiyonlarında İmmün Yanıt	38
3.3.3. Koronavirüs İshalleri	40
3.3.3.1. Koronavirüs Enfeksiyonlarında İmmün Yanıt	41
3.3.4. C. parvum İshalleri	42
3.3.4.1. C. parvum Enfeksiyonlarında İmmün Yanıt	43
4. GEREÇ VE YÖNTEM	47
4.1. Çalışma Materyali (Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması)	47
4.2. Klinik Muayeneler ve Örneklerin Toplanması	47
4.3. Patojenik Etkenlerin Belirlenmesi	48
4.4. Hematokrit ve Total lökosit (WBC) Ölçümleri	49
4.5. Total Protein ve Fibrinojen Analizleri	49
4.5.1. Serum 25-D ve 1,25-D Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	50
4.5.2. Serum Sitokin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	50
4.6. İstatistiksel Analizler	50
5. BULGULAR	51
5.1. Klinik Muayene Bulguları	51
5.2. Hematokrit, WBC, Total Protein ve Fibrinojen Ölçümü Bulguları	51
5.3. Serum Biyokimyasal Muayene Bulguları	52
5.3.1. Serum 25-D ve 1,25-D Analizi Bulguları	52

5.3. 2. Serum Sitokin Analizi Bulguları	52
5.4. Tablolar	56
5.5. Şekiller	69
6. TARTIŞMA	75
7. KAYNAKLAR	94



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, ve C. parvum ve Kontrol grubu buzağuların kalp frekansı (P) (atım/dk) ve vücut sıcaklığı (T) (°C) değerleri.....	56
Tablo 2. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağuların vücut sıcaklığı (T) (°C) ve kalp frekansı (P) (atım/dk) değerlerinin ortancaları, değer aralığı ve gruplar arasındaki farklılığın önemi.....	56
Tablo 3. E. coli grubundaki buzağuların hematokrit, total protein, WBC ve fibrinojen değerleri.	57
Tablo 4. Rotavirüs grubundaki buzağuların hematokrit, total protein, WBC ve fibrinojen değerleri.	57
Tablo 5. Koronavirüs grubundaki buzağuların hematokrit, total protein, WBC ve fibrinojen değerleri.....	58
Tablo 6. C. parvum grubundaki buzağuların hematokrit, total protein, WBC ve fibrinojen değerleri.	58
Tablo 7. Kontrol grubundaki buzağuların hematokrit, total protein, WBC ve fibrinojen değerleri.	59
Tablo 8. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağuların hematokrit (Htc), total protein (TP), fibrinojen (Fb) ve WBC değerlerinin ortancaları, değer aralığı ve gruplar arasındaki farklılığın istatistiksel önemi.	60
Tablo 9. E.coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağuların serum 25-D (ng/ml) ve 1,25-D (pg/ml) düzeyleri.....	61
Tablo 10. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağuların 25-D ve 1,25-D düzeylerinin ortancaları, değer aralığı ve gruplar arasındaki farklılığın istatistiksel önemi.....	62
Tablo 11. E. coli grubundaki buzağuların serum sitokin konsantrasyonları.	63
Tablo 12. Rotavirüs grubundaki buzağuların serum sitokin konsantrasyonları	64
Tablo 13. Koronavirüs grubundaki buzağuların serum sitokin konsantrasyonları.....	65
Tablo 14. C. parvum grubundaki buzağuların serum sitokin konsantrasyonları.....	66
Tablo 15. Kontrol grubundaki buzağuların serum sitokin konsantrasyonları.	67
Tablo 16. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubundaki buzağuların serum sitokin düzeylerinin ortancaları, değer aralığı ve gruplar arasındaki farklılığın istatistiksel önemi.....	68

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Doğal ve kazanılmış bağışıklık komponentleri ve bunların birbirleri ile ilişkileri.	11
Şekil 2. D vitamini sentezinin basamakları	19
Şekil 3. Buzağılarda patojenik etkenlerin görülme sıklığının yaşa göre dağılımı (187)...	46
Şekil 4: Etiyolojik tanıda kullanılan hızlı test kiti	49
Şekil 5. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağıkların 25-D düzeyleri.....	69
Şekil 6. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağıkların 1,25-D düzeyleri.....	69
Şekil 7. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağıkların TNF- α düzeyleri.....	70
Şekil 8. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağıkların IFN- γ düzeyleri.....	70
Şekil 9. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağıkların IL-1 β düzeyleri.....	71
Şekil 10. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağıkların IL-2 düzeyleri.....	71
Şekil 11. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağıkların IL-4 düzeyleri.....	72
Şekil 12. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağıkların IL-5 düzeyleri.....	72
Şekil 13. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağıkların IL-6 düzeyleri.....	73
Şekil 14. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağıkların IL-10 düzeyleri.....	73
Şekil 15. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağıkların IL-12 düzeyleri.....	74
Şekil 16. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağıkların IL-13 düzeyleri.....	74
Şekil 17. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağıkların IL-17 düzeyleri.....	75

KISALTMALAR LİSTESİ

1,25-D: 1,25-dihidroksivitamin D (kalsitriyol)

25-D: 25-hidroksivitamin D (kalsidiyol)

$\alpha\beta$ T : Alfa beta T hücresi

ASH: Antijen sunan hücre

BcoV: Bovine coronavirus-Sığır koronavirüsü

BVDV: Bovine viral diarrhea virus

C. parvum: Cryptosporidium parvum

COVID-19: Coronavirus disease-19-Yeni tip koronavirüs

COX2: Cyclooxygenase-2

CRP: C-reaktif protein

CYP24A1: Cytochrome P450 24A1

CYP27B1: Cytochrome P450 27B1

CYP2R1: Cytochrome P450 2R1

DC: Dentritik hücre

E. coli: Escherichia coli

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ETEC: Enterotoksijenik E. coli

Fb: Fibrinojen

FGF-23: Fibroblast growth factor-23

$\gamma\delta$ T: Gamma delta T hücresi

HCO₃: Bikarbonat

HcoV: Human coronavirus-İnsan koronavirüsü

Htc: Hematokrit

IFN- α : İnterferon- α

IFN- β : İnterferon- β

IgA: İmmünglobulin A

IgE: İmmünglobulin E

IgG: İmmünglobulin G

IFN- γ : İnterferon- γ

IL-1 β : İnterlökin 1 β

IL-2: İnterlökin 2

IL-4: İnterlökin 4

IL-5: İnterlökin 5

IL-6: İnterlökin 6

IL-10: İnterlökin 10

IL-12: İnterlökin 12

IL-13: İnterlökin 13

IL-17: İnterlökin 17

K: Potasyum

LC-MS/MS: Liquid chromatography-mass spectrometry (Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi)

LPS: Lipopolisakkarit

MAP kinase: Mitogen-activated protein kinase

MKP: Mitogen-activated protein kinase phosphatase

MHC: Major histokompatibilite kompleks

mVDR: Membran vitamin D reseptörü

Na: Sodyum

ng/ml: Nanogram/mililitre

NK: Doğal öldürücü hücreler

NSP4: Nonstructural glycoprotein 4

nVDR: Nükleer vitamin D reseptörü

P: Kalp frekansı

pg/ml: Pikogram/mililitre

PRR: Pattern recognition receptor

PTH: Paratiroid hormon

TNF- α : Tümör nekroz faktör-alfa

Tc: Sitotoksik T hücresi

Th1: Yardımcı T hücreleri 1

Th2: T hepler 2

Th17: T hepler 17

TLR: Toll-like reseptör

TP: Total protein

Treg: Regulator (Düzenleyici) T hücresi

TSH: Thyroid stimulating hormon-Tiroid uyarıcı hormon

VDBP: Vitamin D binding protein-D vitamini bağlayıcı protein

VDR: Vitamin D reseptörü

WBC: White blood cell-Total lökosit

1. ÖZET

Buzağılarda neonatal dönemde şekillenen ishaller önemli kayıplara neden olmaktadır. Bu dönemde gerçekleşen ishallerin birçok farklı nedeni bulunmakla birlikte en önemli sebepler viral, bakteriyel ve protozoal kökenli enfeksiyonlardır.

Bu enfeksiyonlarla mücadelede buzağının fonksiyonel bir immün sisteme sahip olmaları hayati önemdedir. İmmün sistem doğal ve kazanılmış immün sistem olarak 2 temel başlıkta incelenmektedir. Enfeksiyon etkenlerine karşı immün cevabın gerçekleşmesinde ve düzenlenmesinde hem doğal hem de kazanılmış immün sistem hücrelerince sentelenen sitokinler görev yapmaktadır. Dolaşımdaki sitokin düzeylerinin belirlenmesi ile immün sistemin fonksiyonları hakkında bir değerlendirme yapılabilmektedir.

Son yıllarda, D vitamininin kalsiyum metabolizmasındaki klasik fonksiyonlarının dışında hem doğal hem de kazanılmış immün sistemde çok önemli rollere sahip olduğu belirlenmiştir.

Literatürde ishalleri buzağılarda D vitamini ve sitokinler arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada, bakteriyel, viral ve protozoal patojenlere bağlı olarak gelişen neonatal buzağı ishallerinde D vitamini ile serum sitokin profili arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmanın materyali, E. coli (n=8), Rotavirüs (n=8), Koronavirüs (n=8), C. parvum (n=8) ve Kontrol (n=8) grupları olmak üzere 5 farklı gruptan toplam 40 adet buzağıdan oluşturulmuştur. Tüm hayvanlardan alınan kan örnekleri kullanılarak, serum 25-hidroksivitamin D (kalsidiyol-25-D) ve 1,25-dihidroksivitamin D (kalsitriyol-1,25-D) düzeyleri sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi-liquid chromatography-mass spectrometry

(LC-MS/MS) yöntemi, serum sitokin düzeyleri ise ELISA yöntemi ile ölçülmüştür.

Serum 25-D düzeyleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Serum 1,25-D düzeyinin E. coli ve Koronavirüs gruplarında Kontrol grubuna oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

TNF- α düzeyinin, E. coli grubunda Kontrol grubuna göre farklılık göstermediği; Rotavirüs, Koronavirüs ve C. parvum gruplarında ise daha düşük olduğu görülmüştür.

IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4 ve IL-17 konsantrasyonları, E. coli grubunda Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek iken, diğer gruplarda önemli düzeyde bir farklılık belirlenmemiştir.

IL-5 konsantrasyonu, E. coli grubunda Kontrol grubuna göre artarken, C. parvum grubunda azalmış, diğer gruplarda istatistiksel bir farklılık olmamıştır.

IL-6 konsantrasyonunun, E. coli ve Koronavirüs grubunda Kontrol grubuna göre önemli bir farklılık göstermediği ancak Rotavirüs ve C. parvum gruplarında Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu belirlenmiştir.

IL-10 konsantrasyonu, Rotavirüs grubunda Kontrol grubuna göre önemli düzeyde daha düşük iken diğer gruplarda önemli bir farklılık bulunmamıştır.

IL-12 konsantrasyonu, E. coli, Rotavirüs ve Koronavirüs gruplarında Kontrol grubuna göre artarken, C. parvum grubunda önemli bir değişiklik olmamıştır.

IL-13 konsantrasyonları yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık saptanmamıştır.

Sonuç olarak, buzağı ishallerinde etiyolojik etkenin türüne göre serum sitokinleri ile D vitamini düzeylerinin farklılık gösterdiği ve D vitamininin buzağı ishallerinde immün yanıtın şekillenmesinde katkısının olabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Neonatal Buzağı, İshal, Sitokin, D Vitamini



2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN SERUM CYTOKINE PROFILE AND VITAMIN D IN CALVES WITH NEONATAL DIARRHEA

Diarrhea in calves in the neonatal period causes significant losses. Although there are many different causes of diarrhea in this period, the most important causes are infections of viral, bacterial and protozoal origin.

It is vital for calves to have a functional immune system in the fight against these infections. The immune system is examined under two main headings as innate and adaptive immune systems. Cytokines synthesized by both innate and acquired immune system cells are involved in the development and regulation of the immune response against infectious agents. Based on the determination of circulating cytokine levels, an evaluation can be made about the functions of the immune system.

In recent years, it has been determined that vitamin D has very important roles in both innate and acquired immune systems apart from its classical functions in calcium metabolism.

There is no study in the literature investigating the relationship between vitamin D and cytokines in calves with diarrhea. In this study, it was aimed to investigate the relationship between vitamin D and serum cytokine profile in neonatal calf diarrhea caused by bacterial, viral and protozoal pathogens.

The material of the study consisted of totally 40 calves from 5 different groups; *E. coli* (n=8), Rotavirus (n=8), Coronavirus (n=8), *C. parvum* (n=8) and Control (n=8) groups. Using blood samples taken from all animals, serum vitamin

D levels were measured by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry-liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) method, and serum cytokine levels were measured by ELISA method.

The results of the study revealed that there was no statistically significant difference between the groups in terms of serum 25-D levels. However, serum 1.25-D level was higher in both *E. coli* and Coronavirus groups compared to the control group.

TNF- α level did not differ in the *E. coli* group compared to the control group but it was lower in the rotavirus, coronavirus and *C. parvum* groups.

While the concentrations of IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4 and IL-17 were statistically higher in the *E. coli* group than in the control group, no significant difference was found in the other groups.

While the IL-5 concentration increased in the *E. coli* group and decreased in the *C. parvum* group compared to the control group, however, there was no statistical difference in the other groups.

It was determined that IL-6 concentration did not differ significantly in the *E. coli* and Coronavirus groups compared to the control group, but it was statistically lower in the Rotavirus and *C. parvum* groups compared to the control group.

While IL-10 concentration was significantly lower in the Rotavirus group than in the control group, no significant difference was found in the other groups.

IL-12 concentration increased in *E. coli*, Rotavirus and Coronavirus groups compared to the control group while there was no significant change in the *C. parvum* group.

There was no statistically significant difference between the groups in terms of IL-13 concentrations.

It was concluded that serum cytokines and vitamin D levels differ according to the type of etiological factor in calf diarrhea and that vitamin D may contribute to the development of the immune response in calf diarrhea.

Key words: Neonatal Calf, Diarrhea, Cytokine, Vitamin D



3. GİRİŞ

Buzağılarda genellikle doğumdan sonraki ilk dört haftalık yaşam süresini ifade eden neonatal dönemde gerçekleşen ishaller, gelişen koruyucu hekimlik ve tedavi uygulamalarına rağmen, Türkiye’de ve dünyada çok önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu dönemde oluşan ishallerin etiyolojisinde hem enfeksiyöz hem de enfeksiyöz olmayan faktörler yer almakla birlikte, bakteriyel, viral ve protozoal kökenli enfeksiyon ishalleri oldukça sık görülmektedir (1).

Vücudu enfeksiyöz ajanlara karşı korumakla görevli immün sistem temel olarak innate (doğal) ve adaptif (kazanılmış) bağışıklık olarak isimlendirilen ve birbirleri ile sıkı ilişki içinde olan iki alt üiteden oluşmaktadır. Doğal immünitinin ana unsurları fiziksel bariyerler (deri ve mukozalar gibi), nötrofiller, dentritik hücreler (DC), monositler, makrofajlar, natural killer (doğal öldürücü, NK) hücreler ve akut faz proteinleridir. Kazanılmış immün sistemin hücreleri B ve T lenfositlerdir (2).

Son yıllarda, D vitamininin kalsiyum ve kemik metabolizmasının düzenlenmesi ile ilgili klasik fonksiyonlarının dışında immün sistemde önemli rollerinin bulunduğunu ortaya koyan çok sayıda araştırma yapılmıştır. Genel olarak D vitamininin doğal immün yanıtı arttırdığı, kazanılmış immün yanıtı ise baskıladığı kabul edilmektedir (3).

Buzağı ishallerinde immün yanıtın bir göstergesi olarak bazı serum sitokin düzeylerinin belirlendiği az sayıda da olsa çalışmalar bulunmaktadır (4- 5). Ayrıca ishalleri buzağılarda 25-D düzeyinin araştırıldığı bazı çalışmalar yapılmıştır (9). Ancak literatürde buzağı ishallerinde dolaşımdaki 25-hidroksivitamin D (kalsidiyol-25-D) ve 1,25-dihidroksivitamin D (kalsitriyol-1,25-D) ile serum sitokin düzeyleri arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bu çalışmada, bakteriyel, viral ve protozoal patojenlere bağlı olarak gelişen neonatal buzağı ishallerinde serum sitokin profili ile D vitamini arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

3.1. İmmün Sistem

İmmün sistem birçok organ, hücre ve dokunun birlikte uyum içerisinde çalışması sonucu, vücudu hastalıklara ve diğer zararlı unsurlara karşı koruyan kompleks bir yapıdır. İmmün sistemin başlıca görevi bakteri, virüs, parazit ve mantarlar gibi patojenlerle savaşarak onları yok etmektir. Diğer bir önemli görevi ise tümör hücreleri gibi normal yapıda olmayan veya yaralanma ve travma gibi nedenlerle hasara uğramış vücut hücrelerini ortadan kaldırmaktır. Bu nedenle enfeksiyöz hastalıklar ve kansere karşı vücudun savunmasında yeterli ve etkin bir immün sistemin varlığı gereklidir (2, 10).

İmmün sistem fonksiyonel olarak doğal ve kazanılmış immünite olarak tanımlanan 2 tip immün yanıt üretir (10). Doğal ve kazanılmış immünite birbirinden bağımsız değildir ve karşılıklı iç birliği içinde çalışır. Buna örnek olarak doğal ve kazanılmış immün sistem hücrelerinin ürettikleri sitokinler aracılığı ile birbirlerini aktive edebilmeleri gösterilebilir (2).

3.1.1. Doğal İmmün Sistem

Patojenlere karşı vücudun ilk cevabını doğal immünite oluşturur. Doğal immüntenin ana unsurları fiziksel bariyerler (deri ve mukozalar gibi); nötrofiller, DC, monositler, makrofajlar, NK hücreleri ile akut faz proteinleridir (11).

Doğal bağışıklıkta görev yapan hücreler proinflamatuvar sitokinler olarak adlandırılan ve doğal immün cevapta düzenleyici rol oynayan sitokinleri (Örn; tümör nekroz faktör (TNF)- α , interlökin (IL)-1 ve IL-6) salgırlar. Doğal immünite doğumdan itibaren fonksiyoneldir. Doğal immünitede hafıza olmadığından fonksiyonlarını gerçekleştirirken patojenlerle daha önceden karşılaşmış olmasının bir gerekliliğı ve önemi yoktur. Fagositik hücreler toll-like reseptörler (TLR) gibi bakteri ve onların yapısal unsurları için spesifik yüzey reseptörlerine sahiptir. Ligandın bu reseptörlere bağlanması ile fagositoz tetiklenir ve bu süreçte patojenler kompleman veya serbest radikaller gibi toksik kimyasallar tarafından yıkımlanırlar. NK hücreleri de yüzey reseptörlerine sahiptir ve salgıladıkları sitotoksik proteinlerle patojenleri yıkımlarlar. Bu şekilde doğal immünite vücuda giren patojenlere karşı ilk defans hattını oluşturur. Ancak bir immün yanıt genellikle, doğal immünite ile ondan daha güçlü ve fleksibıl olan kazanılmış immünitenin birlikte koordineli bir şekilde çalışması ile oluşturulur (12, 13).

3.1.2. Kazanılmış İmmün Sistem

Doğal immünite hızlı gelişen, nonspesifik bir yanıt oluşturmaya ve hafıza hücreleri içermemesine karşın, kazanılmış immünite daha yavaş gelişen, spesifik bir immün yanıt oluşturur ve hafıza hücreleri mevcuttur. Kazanılmış immünitenin iki temel amacı vardır. Bunlardan ilki patojenleri yıkımlayarak ortadan kaldırmak, ikincisi ise sonraki dönemde aynı patojene maruz kalma durumuna karşı uzun süreli ve çok etkili bir koruma sağlamaktır (12).

Kazanılmış immün sistemin hücreleri lenfositlerdir (T ve B hücreleri). T ve B hücreleri kemik iliğindeki hematopoetik kök hücrelerden köken alırlar. Öncül T hücreleri kan yoluyla timusa giderek gelişimini orada sürdürürken, öncül B hücreleri kemik iliğinde gelişimine devam ederler (2, 14).

T hücrelerinin gelişim süreçleri timusta gerçekleşir. Kemik iliğindeki hemopoietik kök hücrelerden oluşan lenfoid öncül hücreler timusa gelir. Multilobüler bir organ olan timusa yerleşen bu öncül hücreler timosit olarak isimlendirilir. Timositler burada farklı hücre yüzeyi belirteçlerinin ekspresyonuna dayalı olarak tanımlanabilen bir dizi olgunlaşma aşamasından geçer. Timositlerin çoğu bu adımlardan geçemez ve apoptoz sonucu ölür. Bu aşamaları tamamlayabilen hücreler ise sonuçta olgun naif T hücreleri olarak tanımlanan alfa beta ($\alpha\beta$) T (CD4 ve CD8) hücreleri ve gamma delta ($\gamma\delta$) T hücrelerine dönüşürler (2, 14).

T ve B hücreleri gelişimlerini sırasıyla timus ve kemik iliğinde sürdürdükleri için bu organlara santral lenfoid organlar adı verilmektedir. Buralardaki gelişimini tamamlayan T ve B hücreleri artık yabancı antijenleri tanıyabilme kapasitesine sahip, immün cevap oluşturabilme yeteneğini kazanmış olgun hücrelerdir ve immünokompetent T ve B hücreleri olarak adlandırılırlar (2, 14).

İmmünokompetent $\alpha\beta$ T hücrelerinin T-helper (Th), T-sitotoksik (Tc), T-regülatör (Treg) ve hafıza hücreleri olmak üzere farklı tipleri vardır. Timustaki T hücre gelişimi sırasında $\alpha\beta$ T hücreleri, Th hücrelerini oluşturmak üzere $CD4^+$, Tc hücrelerini oluşturmak üzere ise $CD8^+$ olarak adlandırılan spesifik yüzey proteinlerine sahip olur (2).

İmmünokompetent T ve B hücreleri henüz herhangi bir antijenle karşılaşmamış olup, kan dolaşımı ile periferik lenfoid organlara (lenf nodülleri, dalak ile mide-bağırsak kanalı, solunum yolları ve derideki epitel ile ilişkili lenfoid dokular) göç ederler. Bu periferik lenfoid organlar, T ve B hücrelerinin antijenlerle karşılaşarak aktive oldukları bölgelerdir. Burada B hücreleri humoral immün cevabı, T hücreleri ise hücre aracılı immün cevabı oluştururlar (15). Vücuda giren bir antijen periferik lenfoid organlardaki immünokompetent T ve B hücrelerini aktive ederek klonal seleksiyon adı da verilen bir immün cevap sürecini başlatır. Antijenlerin çoğu kazanılmış immün sistem hücrelerini direkt olarak uyaramazlar. Bu nedenle bir antijenin etkili bir immün cevap oluşturabilmesi için o antijenin antijen sunan hücreler (ASH; DC ve makrofajlar vb.) tarafından immün sistem hücrelerine sunulması gereklidir. Antijen sunan hücreler vücuda giren antijenleri hücre içine alarak onları antijenik peptid parçalarına ayırır ve hücrenin yüzeyinde bulunan major histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf I veya sınıf II moleküllerine bağlar. Hücre yüzeyinde sunulan antijen artık T hücrelerinde bulunan T hücre reseptörleri ve CD4 (Th) ya da CD8 (Tc) yardımcı molekülleri sayesinde tanınır. CD4⁺ Th hücreleri, MHC sınıf II ile bağlı antijenleri tanırken, CD8⁺ Tc hücreleri ise MHC sınıf I ile bağlı antijenleri tanımaktadır (2). Sunulan antijen tarafından aktive olan immünokompetent Th hücreleri bir farklılaşma ve çoğalma sürecine girer. Th hücreleri Th1, Th2 veya Th17 hücrelerine farklılaşır. Bu süreçte birçok sitokin üretilir ve aktif olur. Bu Th alt grupları salgıladıkları sitokinler ile farklı fonksiyonları yerine getirirler (2, 14).

Th1 hücreleri IL-2, IFN- γ ve TNF- α üretirler ve hücre içi bakteriler ve virüslerle mücadelede görev yapar (16-18). Virüs ve bakteri ile enfekte olmuş hücrelerin öldürülmesinde çok önemli rol oynayan Tc hücrelerinin aktivasyonu için ise Th1 hücrelerince salgılanan IL-2 gereklidir. Th2 hücreleri IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 sitokinlerini üreterek, B hücre proliferasyonunu ve plazma hücrelerinden immünglobulin sekresyonunu uyarırlar. Th2 hücrelerinin hücre aracılıklı reaksiyonlara etkisi yoktur. Bu nedenle hücre dışı patojenlere karşı etkilidir. Th17 hücreleri IL-17 üretirler. IL-17 makrofajlar, DC ve nötrofillerin inflamatuvar etkinliklerini artırır ve hücre dışı patojenlere karşı etkilidirler (19, 20).

İnsanlarda ve farelerde dolaşımdaki lenfositlerin %1-5 kadarı $\gamma\delta$ T hücreleri olup, epitelyal bölgelerde bundan daha fazla oranda bulunurlar (21, 22). Ancak bunun aksine diğer birçok türde (Örneğin; sığır, koyun, domuz ve tavuklar) dolaşımdaki $\gamma\delta$ T hücreleri çok daha yüksek oranda bulunur (23). Ayrıca ruminantlarda dolaşımdaki $\gamma\delta$ T hücresi oranı genellikle diğer evcil hayvan türlerinden daha fazladır. Sığırlarda dolaşımdaki $\gamma\delta$ T hücresi oranının % 15-60 arasında olduğu bildirilmiştir (24). Genç buzağılarda ise dolaşımdaki lenfositlerin % 60'dan daha fazlası $\gamma\delta$ T hücreleridir (23, 25). $\gamma\delta$ T hücrelerinin özellikle genç buzağılarda yüksek oranda bulunması, bu hücrelerin sığırların immün sisteminde önemli fonksiyonları olabileceğini düşündürmektedir.

$\alpha\beta$ T hücreleri konvansiyonel ya da klasik, $\gamma\delta$ T hücreleri ise konvansiyonel ya da klasik olmayan T hücreleri olarak adlandırılır. Bunun nedeni $\alpha\beta$ T hücrelerinin aktivasyonu için antijen sunan hücreler tarafından MHC-peptid sunumu gerekli olmasına rağmen, $\gamma\delta$ T hücrelerinin aktivasyonu için bu şekilde

bir gerekliliğin olmamasıdır. Konvansiyonel $\alpha\beta$ T hücrelerinin aksine $\gamma\delta$ T hücreleri hem doğal bağışıklık hücreleri gibi hem de kazanılmış bağışıklık hücreleri gibi aktive olabilirler. Sığırlarda $\gamma\delta$ T hücrelerinin doğal ve kazanılmış bağışıklık arasında bir köprü görevi yaptığı düşünülmektedir (22, 26). $\gamma\delta$ T hücreleri farklı antijen türlerini doğrudan veya dolaylı olarak tanıyabilir. Bazı $\gamma\delta$ T hücreleri hemen aktive olurken, bazı $\gamma\delta$ T hücrelerinin ikinci bir sinyal ile birlikte uyarılmasına da ihtiyacı vardır. $\gamma\delta$ T hücreleri karşılaştığı antijenleri $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerine sunmak için antijen sunan hücre olarak da görev yapmaktadır. Ek olarak, $\gamma\delta$ T hücreleri, sitokinler, kemokinler ve litik enzimler üreterek sitotoksik ve sitolitik olmayan antiviral aktiviteler yoluyla patojenlerin yok edilmesinde ve doku onarımında koruyucu işlevlerini yerine getirir. $\gamma\delta$ T hücreleri ayrıca DC olgunlaşmasını destekler ve B hücrelerinin antikor üretmesine yardımcı olur (27). $\gamma\delta$ T hücrelerinin birçok sitokini üretebildiği bilinmesine rağmen, önemli oranda ürettikleri sitokinler baz alınarak IFN- γ ve IL-17A üretenler olmak üzere 2 ana alt gruba ayrılabilir (27). Üretilen IFN- γ hücre içi patojenlerin temizlenmesi ve anti-tümör aktivitesi gösterirken, IL-17A hücre dışı bakteriler ile mantarlara karşı etkilidir (28, 29).

T ve B hücreleri aktive olduktan sonra, bu hücrelerin bir kısmı da hafıza hücrelerine dönüşmektedir. Bu hafıza hücreleri canlının tüm hayatı boyunca etkili bir T ve B hücre cevabı için veri tabanı görevi yapar. Böylece daha sonra aynı antijenle karşılaşıldığında daha güçlü ve daha hızlı bir immün cevap şekillenir (12).

3.1.3. Sitokinler

Hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık sisteminin bir düzen içerisinde çalışması için gerekli olan ve sitokin adı verilen moleküller bulunmaktadır. Sitokin, cyto=hücre ve kinos=hareket kelimeleri bir araya getirilerek oluşturulan ve polipeptid, protein ve çoğunlukla da glikoprotein yapısındaki molekülleri tanımlayan genel bir terimdir. Sitokinler hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık sisteminin bir düzen içerisinde çalışması için gerekli olan moleküllerdir (30).

Sitokinler vücuttaki birçok fizyolojik ve patolojik olguda rol alırlar (2, 14, 30). Bunlar:

-İmmün sistemde hücrelerin farklılaşması, aktivasyonu (immünostimülasyon), inaktivasyonu (immünosüpresyon) ve hücre göçünün (kemotaksis) düzenlenmesi,

- Doku homeostazının sağlanması,

- Hematopoezis,

- Yara iyileşmesi ve anjiyogenezisi,

- Otoimmün ve alerjik hastalıkların patojenezi şeklinde özetlenebilir.

Sitokinler fonksiyonlarına, köken aldıkları hücrelere, hedef hücrelere göre interferonlar, interlekinler, tümör nekrozis faktörler ve kemokinler şeklinde sınıflandırılabilir (31).

IFN- γ Th1, sitotoksik T hücreleri, NK ve DC tarafından üretilir (30). Primer olarak intraselüler bakterilere ve tümörlere karşı savunmada immünomodülatör olarak görevlidir. Th1 ve B lenfosit gelişimini ve aktivasyonunu uyarırken Th2 ve Th17'nin gelişimini inhibe eder (30, 32).

TNF, ilk olarak tümör hücrelerinin nekroz ve apoptozuna neden olduğu görüldüğü için bu şekilde isimlendirilmiştir ancak sonradan hücrelerin çoğalması, aktivasyonu ve ölümü gibi birçok olayda rol alan pleiotropik bir sitokin olduğu keşfedilmiştir (33). TNF- α esas olarak monositler/makrofajlar tarafından sentezlenmekte ancak T ve B lenfositler, mast hücreleri, NK, nötrofiller, fibroblastlar ve osteoklastlar gibi başka bazı hücreler tarafından da üretilmektedir (34). TNF- α lokal kan akımını ve vasküler permeabiliteyi artırarak yangı belirteçleri olan ‘kızarıklık, ısı, şişlik, ağrı’ oluşumuna neden olur (33).

IL-1 β monositler, makrofajlar ve DC tarafından üretilen potansiyel bir proinflamatuvar sitokindir (35).

Temel olarak CD4⁺ T hücreleri tarafından üretilen IL-2 ilk olarak T hücre büyüme faktörü olarak keşfedilmiştir. Daha sonra NK hücrelerin sitolitik aktivitesini arttırdığı, T hücrelerinin Th1 ve Th2 hücrelerine farklılaşmasını uyardığı ancak buna karşın Th17 farklılaşmasını ise baskıladığı belirlenen pleiotropik etkinlikte bir sitokindir (36).

IL-4 esas olarak CD4⁺ (Th2), CD8⁺, B hücreleri, mast hücreleri, DC ve bazofiller tarafından sentezlenmektedir (30). IL-4, Th2 tipinde immün cevap oluşturur. IL-13 ile birlikte paraziter enfestasyonlar, alerji, astım gibi hücre dışı bağışıklıkta görevli Tip 2 inflamasyonlarda (IgE üretimi, düz kas kontraksiyonu, mukus üretimi, doğal bağışıklık hücrelerinin bölgeye kemotaksisi v.b.) ana rol alır (37).

IL-5 büyük oranda Th2 hücreleri tarafından üretilir ve eozinofillerin olgunlaşması, gelişmesi ve aktivasyonu aşamalarında rol alan bir sitokindir (38).

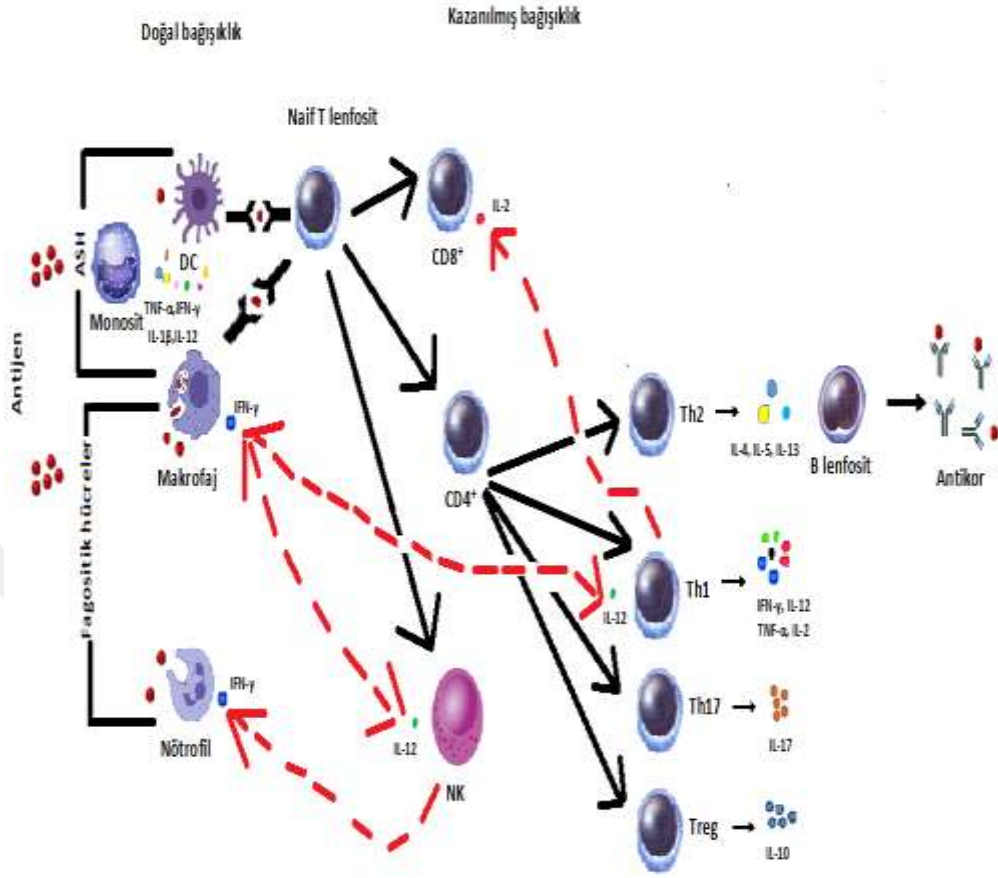
T ve B lenfositleri, monositler, makrofajlar ve fibroblastlar tarafından sentezlenen IL-6, hem proinflamatuvar hem antiinflamatuvar olarak görev yapabilen pleiotropik bir sitokindir ancak proinflamatuvar etkinliği antiinflamatuvar etkinliğinden daha belirgindir (30, 39).

IL-10 Th2 hücreleri tarafından üretilir ve IFN- γ sekresyonunu inhibe ederek Th1 sitokinlerinin sentezini inhibe eder (40).

IL-12 DC, makrofajlar ve B hücreleri tarafından sentezlenmektedir. IL-12 NK ve T hücrelerini IFN- γ üretmeleri için uyarır. Naif Th0 hücrelerinin Th1 hücrelerine dönüşümünü stimüle ederken, Th2 hücrelerine dönüşümünü inhibe eder (41).

IL-13 Th2 hücreleri, bazofiller, mast hücreleri, NK hücreleri ve eozinofiller tarafından sentezlenmektedir ve hem yapısal anlamda hem de fonksiyonel anlamda IL-4 ile benzerlik göstermektedir (30, 42). IL-13, IL-4 ile birlikte özellikle parazit ve alerjenlere karşı savunmada görevli Th2 tipi immün yanıtın en önemli sitokinleri olarak kabul edilmektedir (42).

IL-17 primer olarak Th17 hücreleri tarafından sentezlenir. Güçlü bir proinflamatuvar sitokindir ve tek başına veya TNF- α , IL-1 β gibi sitokinlerle birlikte inflamatuvar yanıt oluşturabilir (30).



Şekil 1. Doğal ve kazanılmış bağışıklık componentleri ve bunların birbirleri ile ilişkileri.

3.1.4. Neonatal Buzağlarda İmmün Sistem

Sığırların sahip olduğu epiteliyokoriyal tipindeki plasenta yapısından dolayı buzağlarda intrauterin dönemde transplasental antikor ve lökosit geçişi yoktur. Buzağı prenatal dönemde intrauterin bir enfeksiyonla karşılaşmadığı sürece, doğduğu zaman antikordan tamamen yoksundur. Bu nedenle de yeni doğan buzağlar için kolostrum yoluyla sağlanan pasif immünite çok önemlidir (43, 44). Kolostrum immünglobulin dışında canlı lökositler, sitokinler ve büyüme faktörleri de içermektedir (45).

Kolostrumda bulunan maternal lökositlerin buzağının immünitesindeki önemini araştırmak için yapılan bir çalışmada bir grup buzağıya taze kolostrum verilmiş, diğer gruba ise dondurulup çözündürülen ve canlı hücre bulundurmeyen kolostrum verilmiştir. Çalışmanın sonunda her iki grubun dolaşımdaki lökosit fenotiplerinin benzer olduğu bildirilmiştir (45).

Buzağılarda immün sistem organlarının germinal merkezleri gebeliğin erken dönemlerinde ortaya çıkmaktadır. Örneğin fetal yaşamın 42. gününde timus ve 55. gününde dalak bulunmaktadır. Fetal lenfositler gebeliğin 40. gününde, fagositik hücreler ise 130. gününde fetusun dolaşımında mevcuttur. Bu hücreler başlangıçta fetal immünitede sınırlı rol alır. Gebeliğin son dönemlerinde nötrofiller fagositoz yapabilir ancak bakterileri öldürme kabiliyeti düşüktür. Perinatal dönemde kortizol konsantrasyonundaki artış sebebi ile nötrofillerin bakterisidal aktiviteleri azalır (46). Gebeliğin 6. ayında ileal peyer plaklarında B ve T lenfositlerin varlığı gösterilmiştir (46, 47).

Buzağılar fetal dönemde ağırlıklı olarak doğal bağışıklık sistemi tarafından korunmaktadır. Doğal bağışıklık gebeliğin geç dönemlerine kadar tam olarak gelişmiş değildir ve doğum yaklaştıkça fetal kortizol düzeyindeki artışa bağlı olarak fonksiyonel kapasitesinde düşüş görülmektedir (48). Neonatal buzağılarda nötrofil, makrofaj ve komplement aktivitesi düşüktür. Ayrıca DC, NK hücre fonksiyonu ve interferon üretimi daha azdır (48).

Sığırlara özgü olarak, yeni doğan buzağılar dolaşımlarında yüksek sayıda (lenfosit havuzunun %60'ına ulaşabilen) $\gamma\delta$ T hücreleri bulundurmaktadır (49).

Hem doğal hem de kazanılmış bağışıklığın önemli karakteristik özelliklerini taşıyan $\gamma\delta$ T hücrelerinin hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık ile ilgili fonksiyonları bulunmaktadır (50, 51). $\gamma\delta$ T hücrelerinin fonksiyonları arasında sitokin ve büyüme faktörlerinin sentezi, B hücrelerinin antikor üretimine yardımcı olma, DC'lerin olgunlaşmalarını uyarma, makrofajları yönlendirme ve tümör hücreleri için sitokinitik etki gösterme bulunmaktadır (52).

Sığırlarda $\gamma\delta$ T hücrelerinin WC-eksprese eden (WC1, WC1.1 ve WC1.2) ve WC-eksprese etmeyen (WC1⁻) olmak üzere alt popülasyonları bulunmaktadır (22). $\gamma\delta$ T hücrelerini $\alpha\beta$ T hücrelerinden ayıran bazı özellikleri vardır. $\alpha\beta$ T hücrelerinin aksine MHC molekülü ile antijen sunumu şartı yoktur (52, 53). $\gamma\delta$ T hücreleri özellikle genç bireylerin immünitesi için önemlidir. $\gamma\delta$ T hücreleri doku-bağımlıdır ve özellikle epidermis, genital dokular, bağırsak ve akciğer dokuları gibi belirli anatomik bölgelerin korunmasında önemli rol almaktadır. Her ne kadar aktive olmuş $\gamma\delta$ T hücreleri yüksek miktarda IFN- γ , TNF ve IL-17 gibi proinflamatuar özellikteki sitokinleri üretebilme kapasitesine sahip olsa da Th1, Th2, Th17 $\alpha\beta$ T hücrelerinin aksine $\gamma\delta$ T hücrelerinin fonksiyonel kapasitesi daha geniştir ve bazı durumlarda IL-13 gibi Th2 sitokinlerini de sentezleyebilme kabiliyeti vardır (27).

In vitro yapılan bir çalışmada DC ve $\gamma\delta$ T hücreleri arasında çift yönlü etkileşim bulunduğu ve bu hücrelerin birbirlerinin fonksiyonel aktivasyonlarını uyardığı gösterilmiştir (53). $\gamma\delta$ T hücreleri DC'lerin gelişmesini ve bu hücrelerin $\alpha\beta$ T hücrelerini uyarabilme kapasitesini arttırmaktadır (26, 27, 53).

Genelde $\gamma\delta$ T hücrelerinin önemli bir IFN- γ kaynağı olduğu ve NK ya da Tc hücrelerine benzer fonksiyonlara sahip olduğu kabul edilmektedir. Ancak $\gamma\delta$ T hücrelerinin alt popülasyonlarının farklı fonksiyonları olabileceği düşünülmektedir. Örneğin IL-12 ile stimülasyon sonucunda WC1.1 hücrelerinden IFN- γ sentezlenmekte, ancak WC1.2 hücrelerinden sentezlenmemektedir (54).

Sığır hücreleri ile yapılan in vitro bir çalışmada $\gamma\delta$ T hücrelerinin önemli düzeyde IL-10 sentezleyerek CD4⁺ ve CD8⁺ hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği, immün-regülatör ve baskılayıcı olarak işlev gördüğü bildirilmiştir (22). Ayrıca *M. avium* subsp. *paratuberculosis* ile doğal yolla enfekte olmuş sığırların ileumunda TNF- α , IFN- γ ve IL-17 sentezleyen WC1 $\gamma\delta$ T hücrelerinin klinik hasta grubunda subklinik hasta ve kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak değişim göstermediği halde IL-10 sentezleyen WC1 $\gamma\delta$ T hücrelerinin subklinik ve kontrol gruplarına göre önemli düzeyde arttığı gösterilmiştir (55).

Buzağının doğumdan itibaren 6. aya kadar CD4⁺ ve CD8⁺ hücre yüzdelерinin görece sabit seyrettiği, buna karşın $\gamma\delta$ T hücre yüzdesinde yaşa bağlı düşüş gözlemlendiği bildirilmiştir (56).

Buzağılarda doğum sırasında lenfositlerin %1-2'sini oluşturan B lenfositlerin yaşla birlikte artış gösterdiği ve 5-6 aylık yaşa gelindiğinde B lenfosit oranının %20-30'a ulaştığı bildirilmektedir (56). Buna sebep olarak buzağının plasenta yapısından dolayı agammaglobülinemik olarak doğup doğumdan sonra çevresel antijenlerle karşılaşmaları gösterilmektedir (48, 56).

Yapılan çalışmalar neonatal buzağının antijenik uyarımlara karşı B yanıtının yetişkinler kadar iyi olmadığını ancak T hücre yanıtının yetişkinlerle benzer olduğunu göstermektedir.

Ayrıca doğumdan sonra kolostrumla alınan maternal antikorların buzağının B hücre yanıtını ve dolayısı ile antijen spesifik immünglobulin sentezini aksattığı ancak T hücre yanıtının bu durumdan etkilenmediği belirtilmiştir (57-60).

Nonnecke ve ark. (57) tarafından yapılan bir çalışmada, neonatal dönemde adaptif immün yanıtın gelişimini değerlendirmek için neonatal buzağılardan iki adet deney grubu oluşturulmuş ve birinci grupta yer alan buzağılar yaşamlarının 1. ve 7. haftalarında iki kez BCG aşısı ile aşılanmıştır. Kontrol grubu olan ikinci buzağı grubuna herhangi bir aşı uygulaması yapılmamıştır. Ayrıca oluşacak immün yanıtı karşılaştırmak için genç yetişkin düvelerden oluşan başka bir deney grubu da aşılanmıştır. Çalışmanın sonucunda aşılanan buzağılarda humoral immün yanıtın yetişkinler kadar iyi olmadığı, ancak TNF- α ve IFN- γ sekresyon düzeyinin yetişkinlere benzer veya daha iyi olduğu, T hücre fonksiyonel kapasitesinin yetişkinlerle benzer düzeyde olduğu ve buzağılarının yetişkinlere benzer şekilde kuvvetli hücresel immün yanıt oluşturabildiği kanaatine varıldığı bildirilmiştir.

Nonnecke ve ark. (58) tarafından yapılan bir diğer deneysel çalışmada, sığırlar gebeliklerinin son 2 ayı içerisinde BCG aşısı ile aşılanmış ve doğan buzağılar iki gruba ayrılarak bir gruba kolostrum verilip diğer gruba verilmemiştir. Buzağılar iki günlük iken BCG aşısı ile aşılanmış ve buzağılarının aşıya karşı oluşturduğu immün yanıt 8 hafta boyunca izlenmiştir. Çalışmanın sonunda kolostrum ile alınan maternal antikorların buzağının antijen spesifik antikor üretimini inhibe ettiği ancak hücresel immün yanıtı çok az etkilediği ya da hiç etkilemediği sonucuna varılmıştır.

Benzer bir başka çalışmada, buzağılar doğumdan sonraki 8 saatlik süre içinde BCG aşısı ile aşılanmıştır. Aşılanan buzağılarda antijen-duyarlı $CD4^+$, $CD8^+$ ve $\gamma\delta$ T hücre popülasyonlarının ve güçlü bir antijen spesifik IFN- γ ve IL-2 yanıtının oluştuğu bildirilmiştir (59).

Dolaşımlarında yüksek düzeyde maternal bovine viral diarrhea virus (BVDV) antikoru bulunduran 2-5 haftalık yaştaki buzağılar deneysel olarak BVDV ile enfekte edildiğinde, maternal antikorların humoral immün yanıtı bloke etmesine rağmen T hücre yanıtını engellemediği ve enfekte edilen buzağılarda BVDV spesifik $CD4^+$, $CD8^+$ ve $\gamma\delta$ T hücre yanıtı geliştirdiği gösterilmiştir (60).

3.2. D Vitamini

D vitamininin keşfinde 15. yüzyıldan beri bilinen raşitizm hastalığı önemli rol oynamıştır. Hastalığın tedavisinde morina balığı karaciğeri yağının etkili olduğu uzun yıllar önce fark edilmiş olmasına rağmen hastalığın etiyolojisi ve tedavisinde morina balığı karaciğeri yağının hangi mekanizma ile etkin olduğu uzun süre ortaya konulamamıştır. 19. yüzyılın sonları 20. yüzyılın başlarında vitaminlerin keşfi ile birlikte Sir Edward Mellanby, raşitizmin besinsel bir eksiklikten kaynaklanıyor olabileceğini düşünmeye başlamıştır. O yıllarda raşitizmin yoğun olarak görüldüğü İngiltere ve İskoçya'da insanların temel besin kaynağı yulaf olduğu için Mellanby, köpekler üzerinde tasarladığı deneysel çalışmada köpekleri yulaf ağırlıklı bir diyetle beslemiş ve sonuçta köpeklerde raşitizm oluştuğunu görmüştür. Bu köpekleri tedavi etmek için morina balığı karaciğeri yağı kullanıldığında etkili olduğunu fark etmiştir. Mellanby bu deneyi yaptığı sıralarda A vitamini keşfedilmişti ve bu vitaminin morina balığı karaciğerinde bulunduğu bilinmekteydi.

Bu bilgiye dayanarak Mellanby yanlılıkla raşitizmi tedavi eden faktörün morina balığı karaciğerinde bulunduğu bilinen A vitamini olduğunu düşünmüştür. McCollum morina balığı karaciğerini ısıya tabi tutarak A vitaminini yıkıma uğratmış ve buna rağmen hala raşitizmi tedavi etme özelliğini kaybetmediğini görmüş ve böylece raşitizmi tedavi eden faktörün A vitamini değil, henüz bilinmeyen başka bir vitamin olduğu kanısına varmıştır (61).

Mellanby köpekler üzerinde çalıştığı sıralarda Huldshinsky ve Chick birbirinden bağımsız olarak raşitizmlı çocukların güneş ışığına veya yapay ultraviyole (UV) ışığına maruz bırakılmasının hastalığın önlenmesinde ve tedavisinde etkili olduğunu bulmuştur. Böylece morina balığı yağı ile UV ışığı arasında ilginç bir benzerlik olduğu görülmüştür. Steenbock ve Hart keçilerde yaptıkları bir çalışmada güneş görmeyen kapalı ortamda beslenen keçilerin kemiklerindeki kalsiyumun önemli bir kısmını laktasyon sırasında kaybettiğini, buna karşın dışarıda güneş ışığı altında beslenen keçilerde kalsiyum balansı ile ilgili bir problem olmadığını belirlemişlerdir. Steenbock UV ışığının inaktif bir maddeyi aktif D vitaminine dönüştürdüğünü ortaya koymuştur (61).

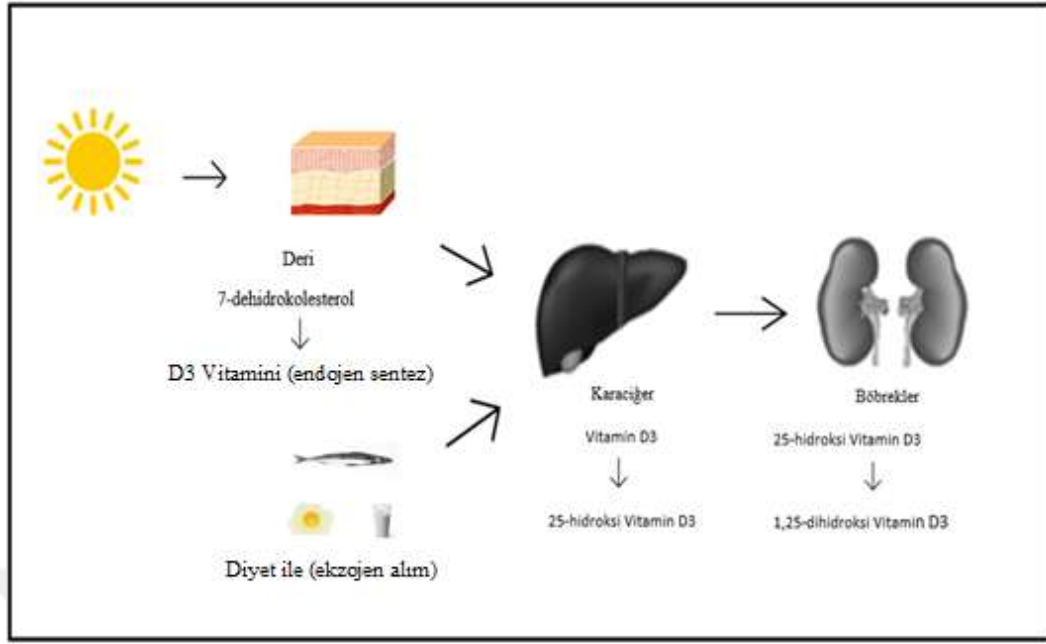
Günümüzde D vitamini, steroid benzeri yapıda olan ve D2 ile D7 arasında isimlendirilen bir grup molekülü ifade eden genel bir terimdir. Bunlardan ergokalsiferol (D2) ve kolekalsiferol (D3) en önemlileridir (62, 63). D1 vitamininin taşisterol ve D2 vitamininin bir eklentisi olduğu ortaya konulmuştur ve başlangıçta hatalı olarak isimlendirilmiş olduğu gösterilmiştir (61).

D2 vitamini mantarlar tarafından ergosterolden UV ışınları aracılığı ile sentezlenir (62). D3 vitamini hem gıda yoluyla alınabilir hem de UV ışınları aracılığıyla epidermiste sentezlenebilir (63).

Sığırlar da dahil olmak üzere çoğu hayvan türünde en önemli D vitamini kaynağı deridir (64). Deride D vitamini sentezi birkaç basamaktan meydana gelir. UV ışınları aracılığıyla 7-dehydrocholesterolden Pre-vitamin D3 ve sonuçta D3 vitamini sentezlenir (64, 65).

D3 vitamini, büyük oranda karaciğerde cytochrome P450 2R1 (25-hydroxylase (CYP2R1)) enziminin aracılık ettiği ve 25-hidroksilasyon olarak adlandırılan bir reaksiyon sonucu 25-hydroxyvitamin D3 (kalsidiyol (25-D))'ye dönüştürülür (66). Vücuda fizyolojik ihtiyaçtan fazla D vitamini alındığında adipoz dokuda ve karaciğerde depolanır ve 25-D'ye dönüştürülmek üzere düzenli olarak dolaşıma verilir (67). Dolaşımdaki 25-D'den proksimal renal tubüllerde veya ekstrarenal dokularda cytochrome P450 27B1 (25(OH)D₃-1 α -hydroxylase (CYP27B1) enzimi aracılığıyla D vitamininin aktif formu olan 1,25(OH)₂D (kalsitriyol (1,25-D)) sentezlenir (68).

Renal 1,25-D sentezi paratiroid hormon (PTH), fibroblast growth factor-23 (FGF-23) ve 1,25-D'nin kendisi tarafından düzenlenir. PTH, CYP27B1 enzimini stimüle ederek 1,25-D sentezini artırır. FGF-23 ise 1,25-D sentezini inhibe eder. 1,25-D, PTH sentezini inhibe ederek, FGF-23 stimülasyonu ile veya direkt olarak böbreklerdeki CYP27B1 sentezini baskılayarak kendisinin sentezini sınırlandırır (69). Ayrıca adrenal ve gonadal hormonlar, prolaktin ve büyüme hormonu gibi başka faktörler de renal D vitamini regülasyonunda rol almaktadır (70).



Şekil 2. D vitamini sentezinin basamakları

3.2.1. D Vitamini Bağlayıcı Protein

D vitamini kanda D vitamini bağlayıcı protein (VDBP)'ye bağlı formda, albümine bağlı formda veya serbest formda bulunabilmektedir. VDBP tüm D vitamini metabolitleri için kan serumunda bağlayıcı olarak görev yapabilen ve hemen hemen tamamı karaciğerde sentezlenen bir proteindir (70). VDBP sentezi D vitamininin kendisi tarafından değil; östrojen, glukokortikoid ve inflamatuvar sitokinler tarafından düzenlenir. 25-D'nin VDBP'ye olan afinitesi 1,25-D'ye oranla 20 kat daha fazladır. Dolaşımdaki D vitamini metabolitlerinin yaklaşık %85'i VDBP'ye bağlıdır. Albümin bu metabolitlerin yaklaşık %15'ine ve VDBP'ye nazaran çok daha düşük afinite ile bağlanır. Yaklaşık olarak 25-D'nin %0,03'ü, 1,25-D'nin ise %0,4'ü kan serumunda serbest halde bulunmaktadır (71).

Serbest hormon hipotezine göre megalin-cubilin kompleksini eksprese edebilen bazı dokular (böbrekler, meme epitelyum hücreleri, paratiroid bezi, epididimal epitelyal hücreler gibi) hariç diğer hücreler herhangi bir proteine bağlı olmayan serbest haldeki 25-D ve 1,25-D'ye bağımlıdır (71). VDBP'nin dolaşımdaki 25-D için büyük bir depo görevi gördüğü ve D vitamini alımının azaldığı durumlarda vitamin yetersizliğini önleyici işlevi olduğu belirtilmektedir (72).

3.2.2. D Vitamini Reseptörü

D vitamini metabolitleri lipofilik özelliklerinden dolayı hücre membranına kolayca penetre olur ve hücre çekirdeğine ulaşabilir. 1,25-D hedef hücrede membran D vitamini reseptörü (mVDR)'ye veya nükleer VDR (nVDR)'ye bağlanarak fizyolojik etkinliğini göstermektedir (63). 25-D'nin VDR'ye affinitesi düşüktür ve ancak çok yüksek konsantrasyonlarda 1,25-D'ye benzer etkinlik gösterebilir (73). İnsanlarda D2 vitamini VDR'ye vitamin D3 kadar iyi bağlanmamaktadır ve D3 formu D2'ye oranla serum 25-D düzeyinin artırılmasında ve sürdürülmesinde daha etkilidir (62).

3.2.3. D Vitamininin İnaktivasyonu

Dolaşımdaki 1,25-D düzeyi arttığında, 25-D ve 1,25-D, 24-hidroksilaz (CYP24A1) enzimi aracılığıyla D vitamininin inaktif metaboliti olan 24,25(OH)₂-vitamin D formuna dönüştürülür. CYP24A1 enzimi başta böbrekler olmak üzere VDR bulunduran bütün hücrelerde bulunur ve böylece sistemik dolaşımın yanı sıra hücre içi 1,25-D düzeyleri de düzenlenebilmektedir (68).

3.2.4. D Vitamininin Mineral Metabolizmasındaki Klasik

Fonksiyonları

Plazma kalsiyum düzeyinin azalması halinde, paratiroid bezlerden PTH sentezi uyarılır. Kan düzeyi artan PTH, böbrek dokusunda bulunan CYP27B1'i aktive eder ve bu enzimin etkisi ile dolaşımdaki 25-D, böbreklerde 1,25-D'ye dönüştürülür (74).

PTH kan kalsiyum düzeyinin regülasyonunda kemik ve böbrekler üzerinde direkt olarak; bağırsaklarda ise 1,25-D aracılığıyla indirekt olarak rol oynar. Osteoklastik stimülasyon yoluyla kemiklerden kana Ca ve P salınımını uyarır. Böbreklerden Ca atılımını ve P geri emilimini azaltır. Bağırsaklardan 1,25-D aracılığıyla Ca ve P emilimini artırır (74).

Kalsiyum bağırsaklardan paraselüler ve transselüler yollarla absorbe edilir. Paraselüler absorpsiyon pasiftir ve lumende kalsiyum konsantrasyonu yüksek olduğunda baskın olan yoldur. 1,25-D hücre içi sıkı bağlantıların permeabilitesini arttırmak suretiyle paraselüler kalsiyum emiliminde görev alır. Ancak 1,25-D'nin asıl etkisi aktif yol olan transselüler emilim üzerinedir. 1,25-D intestinal epitelyal hücrelerden kalbindin sentezini artırır. Kalbindin kalsiyum bağlayıcı bir proteindir ve kalsiyumun mikrovillüslerden geçişini kolaylaştırır (75).

Bağırsaklardan emilen kalsiyum miktarının normal serum kalsiyum düzeyinin sürdürülmesinde yetersiz kalması durumunda 1,25-D, PTH ile birlikte osteoklastojenezisi stimüle eder ve ayrıca böbreklerden kalsiyum reabsorpsiyonunu artırır (70).

D vitamini tarafından plazma Ca düzeyinin arttırılmasında en önemli hedef organlarından biri distal renal tubüllerdir. Aslında D vitamini yokluğunda bile filtre edilen kalsiyumun %99'u renal tubüllerden reabsorbe edilir. Ancak kalan %1'lik kısmın geri Emilimi için D vitamini ve PTH gereklidir (61).

D vitamininin klasik fonksiyonları kemik ve mineral metabolizması ile ilgilidir. D vitamini yetersizliği yavrularda raşitizm, yetişkinlerde osteomalazi oluşumuna sebep olur (76).

3.2.5. D Vitamininin Non-Klasik Fonksiyonları

Uzun yıllar CYP27B1 sentezinin insan ve hayvanlarda sadece böbreklerde ve plasentada olduğu varsayılmıştır. Ancak böbreklerin dışında epitel doku, makrofajlar, kemik ve kıkırdak doku, karaciğer, endokrin bezler, plasenta, beyin ve bazı tümör hücrelerinde CYP27B1 enziminin varlığı, dolayısıyla bu hücrelerin de 1,25-D sentezleyebildiği gösterilmiştir (69).

Ancak ekstrarenal 1,25-D sentezi bazı yönlerden renal sentezden oldukça farklıdır. Ekstrarenal 1,25-D sentezi, lipopolisakkarit (LPS) ve sitokinler (IFN- γ , TNF- α , IL-2) gibi bazı inflamatuvar sinyallerin immün hücrelerde CYP27B1 ekspresyonunu uyarması ile gerçekleşir. IFN- β , IL-10, IL-4 makrofajlardan 1,25-D sentezini azaltır. Buna karşın renal CYP27B1 sentezi LPS tarafından etkilenmez (68, 77).

İn vitro olarak FGF23'ün böbrek dokusunda olduğu gibi monositlerdeki CYP27B1 aktivitesini de azalttığı gösterilmiştir. Ancak renal CYP27B1'in aksine makrofajlar tarafından sentezlenen CYP27B1, artan 1,25-D konsantrasyonuna bağlı olarak feedback mekanizması ile baskılanmaz. Ekstrarenal 1,25-D sentezi dolaşımdaki 1,25-D düzeyinden çok 25-D düzeyinden etkilenir (77).

Makrofajlardaki CYP27B1 enzim aktivitesi glukokortikoidler gibi antiinflamatuvar ilaçlar tarafından önemli ölçüde baskılanabilirken bu antiinflamatuvar ilaçların renal CYP27B1 sentezi üzerine etkinliği çok azdır veya hiç yoktur (77).

Ekstrarenal olarak üretilen 1,25-D'nin lokal olarak otokrin veya parakrin tipte etkinlik gösterdiği ve dolayısıyla dolaşımdaki 1,25-D konsantrasyonunda önemli bir değişikliğe neden olmadığı öne sürülmüştür (78). Ancak sarkoidozis ve Crohn hastalığı gibi bazı hastalıklarda başta makrofajlar olmak üzere ekstrarenal 1,25-D üretiminin dolaşımda hiperkalsemi ve hiperkalsüri oluşturabilecek kadar yüksek düzeyde olabileceği bildirilmiştir (68). Dabak ve ark. (79) bilateral nefrektomi yapılan ratlarda antijenik uyarımın dolaşımda belirgin bir 1,25-D artışına neden olduğunu ortaya koymuşlardır.

Ekstrarenal 1,25-D sentezinin mümkün olduğunun belirlenmesinin yanı sıra, organizmadaki birçok farklı hücre tipinde VDR'lerin varlığı da ortaya konulmuştur. Böylece D vitamininin klasik fonksiyonlarının dışında başka farklı birçok fizyolojik etkileri olduğu ileri sürülmeye başlanmıştır (80). Bunlardan bazıları hücre proliferasyonu, hücrelerin farklılaşması, apoptoz, santral sinir sistemi, deri, metabolizma ve immün yanıtın düzenlenmesidir (81). D vitamininin diyabet, romatoid artrit, kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon ve bazı kanser türleri gibi birçok hastalıkla ilişkili olduğu bilinmektedir (76). Ayrıca ekstrarenal 1,25-D, tip II epitelyal pnömositlerin sürfaktan madde üretiminde rol oynar, insülin ve thyroid stimulating hormon (tiroid uyarıcı hormon, TSH) sekresyonunu stimüle eder (80).

3.2.5.1. D Vitamini ve İmmün Sistem

Bütün immün sistem hücrelerinde VDR ekspresyonu bulunmaktadır (74). Ayrıca birçok immün hücrede (monositler, makrofajlar ve DC) 1,25-D'nin sentezlendiği ve bunun hem üretildiği hem de diğer immün hücrelerdeki VDR'lere bağlanarak immün sistemde önemli roller üstlendiği ortaya konulmuştur (82).

D vitamini antiinflamatuvar ve immünsupresif etkinlik gösterir ve bunu farklı yollarla gerçekleştirir. 1,25-D, FGF-23'ün inflamatuvar aktivitesini inhibe eder (83). Önemli proinflamatuvar moleküllerden olan prostaglandin E2 sentezini ve prostaglandin sentezinde görev alan cyclooxygenase-2 (COX2) sentezini baskılar (84).

C-reaktif protein (CRP) enfeksiyonlar sırasında plazma konsantrasyonu hızla artan bir akut faz proteinidir (2). Serum 25-D düzeyi ile CRP arasında negatif korelasyon olduğu bildirilmiştir (85).

D vitamini antioksidanların üretimini arttırarak birçok inflamatuvar hastalığın patojenezinde rol alan reaktif oksijen türlerini baskılar (86).

İnflamatuvar hastalıklarda artan proinflamatuvar sitokinler karaciğerden hepsidin sekresyonunu arttırır. Hepsidin demirin retikuloendotelial hücreler içinde kalmasına neden olarak eritropoezis ve hemoglobin sentezini sınırlandırır (63). İn vivo yapılan bir çalışmada D vitamini suplementasyonu yapılan bireylerin plazma hepsidin konsantrasyonunun kontrol grubuna göre önemli düzeyde düştüğü bildirilmiştir (87).

İnflamatuvar patojenite ile karakterize kronik enteropatili köpeklerde yapılan bir çalışmada D vitamini ile nötrofil, monosit ve IL-2 arasında negatif korelasyon olduğu gösterilmiştir. Ancak düşük D vitamini düzeyinin hastalığının sebebi mi yoksa sonucu mu olduğu ortaya konulamamıştır (88).

M. tuberculosis ile stimüle edilen periferik kan mononükleer hücreleri ile yapılan bir in vitro çalışmada, ortamda 1,25-D bulunması durumunda IL-10 sekresyonunun arttığı, buna karşın IL-6, TNF- α ve IFN- γ sentezini ise azaldığı bildirilmektedir (89). M. tuberculosis ile stimüle edilen alveolar makrofajlar ile yapılan başka bir çalışmada, 1,25-D'nin IL-1 β üretimini indüklediği gösterilmiştir (90). Benzer şekilde kemik iliği kökenli makrofajların LPS ile aktive edildiğinde artan IL-6 ve TNF- α sentezinin 25-D ve 1,25-D tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (91). Jaffey ve ark. (92) tarafından yapılan bir çalışmada, yoğun bakım ünitesindeki köpeklerden periferik kan örnekleri toplanmış, LPS ile stimüle edilmiştir. 1,25-D ile birlikte inkübe edilen grupta kontrol grubuna göre proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- α üretiminin azaldığı, buna karşın antiinflamatuvar bir sitokin olan IL-10 sentezinin arttığı gösterilmiştir.

Tip II interferon olan IFN- γ , 25-D'den 1,25-D üretimini stimüle ederken, Tip I interferonlar (IFN- α , IFN- β) ise 1,25-D üretimini bloke etmektedir. Tip I IFN yanıtı daha agresif hastalıklar ile, tip II IFN ise yanıtı daha ılımlı hastalıklarla ilişkilendirilmektedir (93).

D vitamini genel olarak proinflamatuvar sitokinleri baskılayarak antiinflamatuvar sitokinlerin sentezini stimüle etmektedir. Dolayısıyla D vitamininin doğal bağışıklığı kuvvetlendirdiği, kazanılmış bağışıklığı ise sınırlandırdığı kabul edilmektedir (68).

3.2.5.1.1. D Vitamininin Doğal Bağışıklıktaki Rolü

Doğal bağışıklığın yapıtaşları, konak hücrede bulunmayan, buna karşın farklı mikroorganizmalarda ortak olarak bulunan ve pattern olarak adlandırılan yapıları tanırlar (2). Doğal bağışıklık sistemi bu yapıları pattern recognition receptors (PRR) olarak adlandırılan reseptörler aracılığı ile tespit eder. PRR'ler antimikrobiyal peptidlerin ve çeşitli sitokinlerin üretimini tetikler (94).

TLR, PRR'lerden biridir. TLR'ler mikrobiyal ligandları tanır ve doğal bağışıklığı tetikler. TLR aktivasyonu sonucu makrofajların fagositoz kapasitesi artar, antimikrobiyal peptid üretimi indüklenir ve ayrıca direkt antibakteriyel ve antiviral etki oluşur (95). İn vitro yapılan bir çalışmada TLR aktivasyonu sonucu makrofajlarda CYP27B1 ve VDR genlerinin ekspresyonunun bir antimikrobiyal peptid olan katelisidin sentezini indüklediği gösterilmiştir. Bu çalışmada M. tuberculosis ile enfekte makrofajların bulunduğu ortama dışarıdan 1,25-D eklendiğinde canlı tüberküloz basili sayısında önemli düşüşler olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada CYP27B1 veya VDR inhibe edildiğinde katelisidin sentezinde ve dolayısı ile antimikrobiyal aktivitede çok önemli azalma olduğu vurgulanmıştır (96).

Antimikrobiyal peptidler kemoatraktant olarak, DC aktivatörü olarak veya direkt antimikrobiyal efektörler olarak görev yapabilen peptidlerdir. 1,25-D, katelisidin ve defensin $\beta 2$ antimikrobiyal proteinlerini indükler (98). Katelisidin bakteri ve mantarların membranlarını destabilize eder, ayrıca virüsün yapısını bozarak direkt antiviral etki gösterir ve böylece virüsün konakçı hücrelerde yaşam gücünü azaltır (98). Defensinler doğal bağışıklıkta görevli, geniş spektrumlu antimikrobiyal ve immünmodulator fonksiyonlara sahip peptidlerdir (99).

Angiogenin-4 enterik bakterilerin dokulara invazyonunu engellemede etkili olan antimikrobiyal bir peptittir. D vitamini yetersizliğinin angiogenin-4'ü baskıladığı gösterilmiştir (100).

1,25-D, C14 reseptör ekspresyonunu artırır (66). CD14 reseptörü monositler, makrofajlar ve granüositlerde bulunur ve LPS ile uyarılan hücrelerin aktive edilmesinde rol alır (2).

Nötrofiller fagositoz yoluyla, reaktif oksijen türleri üreterek veya granüllerinden antimikrobiyal proteinler salgılayarak mikroplara karşı savaşır (101). D vitamininin nötrofiller üzerine olan etkisi hakkında sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Nötrofillerin VDR bulundurduğu bilinmektedir (102), ancak CYP27B1 enzim sentezinin bulunmadığı ve dolaşımdaki 1,25-D tarafından fonksiyonlarının düzenlendiği düşünülmektedir (94). Yapılan bir çalışmada 1,25-D'nin nötrofillerde apoptozisi arttırdığı bildirilmiştir. Başka bir çalışmada 1,25-D'nin nötrofillerin Streptococcus pneumonia etkenlerini öldürme kabiliyetini arttırdığı ve inflamatuvar sitokin üretimini azaltıp antiinflamatuvar sitokin olan IL-4 sentezini arttırdığı bildirilmiştir (94).

Eozinofiller, hücre dışı enfeksiyöz etkenlere karşı savunmada görevli hücrelerdir. D vitamini eozinofilleri inhibe eder, D vitamini yetersizliğinde eozinofil aracılı inflamasyonda artış olduğu bildirilmiştir (83).

NK hücreleri, enfekte hücreleri öldürerek ve makrofajları aktive ederek hücre içi mikroorganizmalara karşı savunmada görev yapan hücrelerdir (2). 1,25-D, NK hücrelerinin sitotoksik fonksiyonlarını kuvvetlendirir ve aynı zamanda inflamatuvar sitokin ekspresyonunu azaltır (103).

Fagositik hücrelerden olan monositler, nötrofillerden farklı olarak damar dışı dokularda daha uzun süre yaşar ve dokulara yerleşen monositler farklılaşarak makrofaj olarak isimlendirilir (2). Patojenle karşılaşan monosit ve makrofajlarda VDR ve CYP27B1 ekspresyonu artarak, enfeksiyon bölgesinde 1,25-D üretimi gerçekleşir (104, 105). Bu hücrelerde hem CYP27B1 enzim aktivitesi yüksek düzeylere çıkabildiği için hem de CYP24A1 enzim aktivitesi pek etkin olmadığı için makrofajların aktivitesinin arttığı bazı hastalıklarda dolaşımdaki 1,25-D artışına bağlı olarak hiperkalsemi ve hiperkalsiüri semptomları gözlenebilmektedir (69, 98). 1,25-D, monositlerin ve makrofajların antimikrobiyal etkinliğini artırır ancak bu hücrelerin T lenfositleri stimüle etme kapasitesini düşürür ve böylece doğal bağışıklığı kuvvetlendirirken kazanılmış bağışıklığı baskılar (106). 1,25-D, monositlerin makrofajlara dönüşümünde görev alır, bunun yanında DC olgunlaşmasını inhibe eder ve daha tolerojenik yapıda olmalarını sağlar (63, 101, 107). Ayrıca proinflamatuvar karakterde olan M1 makrofaj yanıtını anti-inflamatuvar karakterli M2'ye dönüştürür (83, 107). D vitamini makrofajlarda ve DC'lerde proinflamatuvar yanıt oluşumunda görevli bir protein olan nükleer faktör κ B aktivitesini baskılayarak inhibitör κ B ekspresyonunu arttırmaktadır (107).

İn vitro olarak LPS ile stimüle edilen sığır monositlerinde CYP27B1 gen ekspresyonu ve dolayısı ile 1,25-D sentezinin önemli düzeyde arttığı gösterilmiştir (105).

İn vitro yapılan bir çalışmada, 1,25-D'nin makrofajlar tarafından fagosit edilmiş olan E. coli etkenlerinin makrofajların içindeki replikasyonunu sınırladığı bildirilmiştir (108).

DC kazanılmış bağışıklık hücrelerine antijen sunmakla görevli hücrelerdir. D vitamini in vitro olarak DC'lerden IL-12 sekresyonunu azaltırken, IL-10 sekresyonunu artırır ve böylece DC'lerin gelişimini sınırlandırır ve daha tolerojenik bir durumda kalmalarına neden olur (103). Bu etki plazmasitik DC'lere oranla myeloid DC'lerde daha belirgindir. Normal koşullarda myeloid DC naif T hücre yanıtını başlatmada daha aktiftir. Buna karşın plazmasitik DC daha tolerojenik ve immünsupresif karakterdedir (100).

Sığır monositik DC ile in vitro yapılan bir çalışmada 1,25-D eklenen hücre kültürlerinin eklenmeyenlere oranlara daha fazla IL-10 ve daha az IL-12 sentezlediği bildirilmiştir (109).

3.2.5.1.2. D Vitamininin Kazanılmış Bağışıklıktaki Rolü

Makrofajlar ve DC gibi antijen sunan hücreler tarafından uyarılan T lenfositlerin sitokin, B lenfositlerin ise immünglobulin üreterek antijenlere karşı spesifik olarak vücudu savunması, kazanılmış bağışıklığın temelini oluşturmaktadır (69).

Aktive olmamış yani dinlenme durumundaki T hücreleri CYP27B1 enzim aktivitesi göstermez ve düşük düzeyde VDR eksprese ederler. T hücrelerinin aktivasyonundan 24-48 saat sonra CYP27B1 ve VDR aktive olmaktadır. Bu nedenle 1,25-D'nin antijen ortadan kaldırıldıktan sonra T hücrelerinin pasifize edilmesinde görevli olduğu düşünülmektedir (110).

Genel olarak 1,25-D, Th1/Th17 yanıtını Th2/Treg yanıtına dönüştürmektedir (111-113). IL-17 birçok otoimmün hastalığın patojenezinde rol almaktadır. Ancak aynı zamanda özellikle mukoz membranların patojenlere karşı savunmasında da önemli görevleri bulunmaktadır.

Bu nedenle IL-17'nin baskılanması vücudun bazı enfeksiyöz etkenlere karşı savunma gücünü azaltabilmektedir. *Citrobacter rodentium* ile enfekte edilen farelere intraperitoneal 1,25-D uygulandığında farelerin enfeksiyona duyarlılığında ve dokulardaki bakteri sayısında artış olduğu bildirilmiştir (114).

Th1 hücrelerinin aktivasyonu sonucu IFN- γ sentezi artar. IFN- γ makrofajlarda CYP27B1 sentezini arttırdığı bilinen en güçlü stimülatördür (115). D vitamininin in vitro olarak IFN- γ sentezini ve dolayısı ile Th1 immün yanıtını baskıladığı ve aynı zamanda IL-4, IL-5 ve IL-10 üretimini arttırarak Th2 yanıtını kuvvetlendirdiği gösterilmiştir (116). D vitamini yetersizliği durumunda birçok otoimmün hastalığın ortaya çıkma riski veya var olan hastalığın şiddeti arttırmaktadır (100).

CD8⁺ T hücrelerinin CD4⁺ T hücreleri, B hücreleri ve makrofajlara oranla daha fazla VDR bulundurduğu bildirilmiş (118, 119) olmasına karşın ilginç bir şekilde CD4⁺ T hücrelerinin aksine CD8⁺ T lenfositlerin 1,25-D'ye yanıtı zayıftır (80, 118).

Naif B hücreleri antijenle karşılaştığında aktivasyona uğrar. Aktive olmuş B hücreleri klonal çoğalma ve farklılaşma aşamalarından geçtikten sonra bir kısmı immünglobulin salgılayan plazma hücrelerine, bir kısmı ise uzun ömürlü bellek hücresine dönüşmektedir (2).

B hücrelerinde dinlenme durumunda düşük düzeyde olan VDR ve CYP27B1 ekspresyonu B hücreleri aktive olduğunda artar (119).

İn vitro yapılan bir çalışmada, 1,25-D'nin B hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ederek apoptozu uyardığı ve ayrıca B hücrelerinin hafıza B hücrelerine ve plazma hücrelerine dönüşümünü inhibe ettiği gösterilmiştir (119).

Bu etkilerinden dolayı 1,25-D'nin otoantikor sentezinin azaltılmasına yardımcı olduğu ve otoantikor aracılı otoimmün hastalık riskini azalttığı düşünülmektedir (98).

1,25-D'nin B hücrelerinde IL-10 sentezini arttırdığı gösterilmiştir (120). Ayrıca in vitro yapılan bir çalışmada 1,25-D'nin B hücrelerinden IgE sentezini azalttığı bildirilmiştir (121).

3.2.5.1.3. D Vitamini ve İntestinal İmmünite

Bağırsaklarda bulunan bütün hücre popülasyonları CYP27B1 aktivitesine sahiptir ve bağırsaklar D vitamini açısından aktif bir bölgedir (103).

D vitamininin intestinal epitelyal bariyer fonksiyonunu kuvvetlendirdiği ve özellikle inflamatuvar durumlarda intestinal epitelyal hücrelerin apoptozunu azalttığı gösterilmiştir (103). Apoptoz artışı neonatal buzağı diyarelerinin patojenezinde önemli bir yere sahiptir.

İntestinal epitelyal hücre kültürüne LPS eklendiğinde TNF- α sentezinin arttığı, epitelyal permeabilitenin arttığı ve hücrelerin yaşama gücünün azaldığı; ortama 1,25-D eklendiğinde ise tüm bu etkilerin azaldığı bildirilmiştir (122).

Başka bir in vitro çalışmada 1,25-D, E. coli'nin neden olduğu permeabilite artışını engellemiş ve bağırsak mukozasının fiziksel bütünlüğünün korunmasını sağlamıştır (123).

3.2.5.1.4. D Vitamini ve Enfeksiyöz Hastalıklar

Enfeksiyöz hastalıkların tedavisinde D vitamini kullanımı aslında D vitamininin keşfinden çok daha önceye dayanmaktadır. Hipokrat ilk kez tüberküloz tedavisinde güneş ışığını kullanmıştır (124).

Bazı enfeksiyöz ve inflamatuvar hastalıklarda serum 25-D düzeyinin azaldığı, 1,25-D düzeyinin ise arttığı bildirilmiştir (125, 126).

Dabak ve ark. (127) tarafından yapılan bir çalışmada, Koriza Gangrenoza Bovumlu sığırlarda serum 1,25-D konsantrasyonlarının kontrol grubuna oranla önemli düzeyde arttığı gösterilmiştir. Serum PTH konsantrasyonunun ise kontrol grubuna oranla daha düşük olduğu belirlenmiştir. 1,25-D düzeyindeki bu artışın ektrarenal sentezden kaynaklanmış olabileceği ileri sürülmüştür.

Deneyisel olarak BVDV ile enfekte edilen buzağılarda enfeksiyondan sonra serum 25-D düzeyinin kontrol grubuna göre önemli düzeyde azaldığı; 1,25-D düzeyinde ise istatistiksel olarak farklılık olmadığı gösterilmiştir (128).

Giardia duodenalis ile enfekte kuzularda serum 25-D düzeyi kontrol grubuna göre daha düşük olarak bulunmuştur (129).

Sığırlarda yapılan bir çalışmada intramammar Streptococcus uberis infüzyonu ile mastitis oluşturulduktan sonra hayvanlar iki gruba ayrılmış ve bir grup intramammar 25-D ile tedaviye alınmış diğer gruba ise herhangi bir tedavi uygulanmamıştır. 25-D ile tedavi edilen grupta sütteki bakteri sayısının azaldığı gözlenmiştir (130).

Köpeklerde yapılan bir çalışmada kritik hastalığı olan köpeklerin serum 25-D seviyeleri sağlıklı kontrol grubuna oranla önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur (131).

3.2.5.1.5. Organizmanın D Vitamini Durumunun Değerlendirilmesi

Fizyolojik olarak en aktif D vitamini metaboliti 1,25-D'dir. Ancak D vitamini düzeyi belirlenirken çoğunlukla serum 25-D seviyesine bakılmaktadır. Bunun birkaç farklı nedeni vardır.

İnsanlarda vitamin D ile ilişkili hastalıkların çoğunda 1,25-D değil 25-D düzeyinde değişim olduğu görülmektedir (93). 25-D'nin yarı ömrü 20-24 gün iken 1,25-D'nin yarı ömrü 4-15 saattir. 1,25-D'nin dolaşımdaki konsantrasyonu 25-D'nin yaklaşık 1/1000 kadardır. Bunlara ek olarak D vitamininin 25-D hidroksilasyonu büyük oranda substrat bağımlı bir reaksiyondur yani dolaşımdaki 25-D düzeyi, diyetle vücuda alınan ve deride sentezlenen toplam D vitamini miktarı ile orantılıdır (67). Bundan dolayı D vitamini düzeyinin belirlenmesinde 25-D düzeyi daha kullanışlı olarak kabul edilmiştir.

Kan serumu herhangi bir antikoagulant içermediğinden D vitamini metabolitlerinin ölçümü için en uygun materyal olarak kabul edilmektedir (132).

D vitamini metabolitlerinin belirlenmesinde farklı bazı yöntemler bulunmaktadır. LC-MS/MS ölçüm metodu altın standart olarak kabul edilmektedir (132).

3.3. Neonatal Buzağı İshalleri

Neonatal dönem adı verilen doğumdan sonraki ilk dört haftalık sürede meydana gelen buzağı kayıplarının %50'den fazlasının ishal kaynaklı olduğu bildirilmektedir (1). İshal oluşumunda enfeksiyöz etkenler, buzağının immünitesi, beslenme ve çevresel faktörler gibi birçok farklı sebep rol almaktadır.

Buzağı ishalleri enfeksiyöz veya non-enfeksiyöz başlıkları altında gruplandırılabilir. Bakteri, virüs ve protozoa gibi farklı türden patojenler tek başlarına veya miks enfeksiyonlar şeklinde ishal oluşturabilmektedir (1). Buzağı ishallerinde en sık karşılaşılan enfeksiyöz etkenlerin Escherichia coli (E. coli), Rotavirüs, Coronavirüs (Koronavirüs) ve Cryptosporidium parvum (C. parvum) olduğu bildirilmektedir (134-136).

İshal patofizyolojik olarak; absorpsiyon kapasitesinin azalması (malabsorpsiyon), ozmotik basınç artışı, sekresyon artışı, anormal bağırsak hareketliliği, hidrostatik basınç artışı, gastrointestinal inflamasyon ve villöz epitelyal hücre erozyonu gibi mekanizmalar ile oluşabilmektedir (137). Villöz epitelyal hücrelerin kaybı maldigesyona sebep olabilir. Çünkü bu hücreler sütün sindiriminde görevli laktaz gibi bazı önemli enzimleri üretmektedir (135).

Enfeksiyöz etken ve mekanizması ne olursa olsun ishal sebebiyle gaita ile sıvı ve elektrolit atılımı artar ve buna bağlı olarak hayvanda dehidrasyon, elektrolit bozuklukları, metabolik asidoz, negatif enerji dengesi ve D-laktat artışı şekillenebilir (138).

Metabolik asidoz fekal bikarbonat kaybına, perfüzyonu azalan dokularda artan L-laktat üretimine ve bağırsaklarda bakteriyel fermantasyon sonucu D ve L-laktat artışına bağlı olarak gelişir (137).

Dehidrasyon ve asidoza bağlı olarak emme refleksi bozulur. Vasküler kollaps ve elektrolit bozukluklarına bağlı gelişen kalp yetmezliği, malnutrisyon ve hipoglisemi sonucu ölüm gerçekleşebilir. Ayrıca E. coli gibi bazı Gr (-) bakteriyel enfeksiyonların sebep olduğu enterotoksemi direkt olarak dolaşım yetmezliğine sebep olabilir (137).

3.3.1. E. coli İshalleri

E. coli normal bağırsak florasında bulunan Gr (-) bir bakteridir ve E. coli popülasyonunun sadece küçük bir kısmı patojenik olarak değerlendirilmektedir (135, 139). E. coli diyareleri tipik olarak 3 günlükten küçük yaştaki buzağılarda ortaya çıkmaktadır. Ancak rotavirüs ile eşzamanlı enfeksiyonlarda bu süre 7-14 günlük yaşa kadar uzayabilmektedir (135).

Enterik kolibasiloz olarak da adlandırılan E. coli enfeksiyonları buzağılarda enterik veya septisemik formlarda ortaya çıkmaktadır (139).

İshal oluşturan 6 adet major E. coli patotipi vardır. Bunlar; enterotoxigenic (enterotoksijenik), enteropathogenic (enteropatojenik), shiga toxin producing (shiga-toksin üreten, enterohemorajik E. coli dahil), enteroaggregative (enteroagregatif), diffusely adherent (diffüz bağlanan) ve enteroinvasive (enteroinvazif)'dir (140). Enterotoksijenik E. coli (ETEC) K99 fimbriya, ısı-dayanıksız labil toksin ve ısı stabil toksin üretir. K99 antijeninin ince bağırsak epitelyumuna bağlanma kabiliyeti buzağının yaşına bağlıdır ve 12. saatten 2 haftalık oluncaya kadar kademeli olarak azalır (134).

Shiga toksin üreten/Enterohemorajik E. coli enfeksiyonları intestinal mukozada sitotoksik hasara sebep olur ve mukohemorajik kolitis, dizanteri gibi semptomların ortaya çıkmasına neden olur (137).

E. coli ishallerinde sekresyon artışı şekillenir (135). E. coli toksinleri bağırsak lumenine sodyum (Na), klor (Cl), potasyum (K) ve bikarbonat (HCO_3) sekresyonunu arttır ve buna bağlı olarak gelişen ozmotik etki ile su bağırsak lumenine geçer (134, 137). E. coli ishallerinin patojenezinde sekresyon artışının yanında absorpsiyon kapasitesinin düşmesinin de rolü bulunmaktadır. Isı stabil toksin sodyumu hücre içine alıp hidrojen iyonunu hücre dışına çıkaran membran proteinini inhibe ederek malabsorbiyona neden olmaktadır (134). E. coli ishallerinde kısa süre içerisinde şiddetli dehidrasyon tablosu oluşabilmektedir. Bağırsakların lumenine sıvı geçişine bağlı olarak bazen hayvanda klinik olarak henüz ishal oluşmamasına rağmen hayvan dehidrasyona ve/veya elektrolit kaybına bağlı olarak ölebilir (141).

3.3.1.1. E. coli Enfeksiyonlarında İmmün Yanıt

E. coli gibi Gr (-) bakterilerin hücre duvarında bulunan LPS, immün sistem hücrelerinde yüksek düzeylerde sitokin sentezine neden olur. LPS, sepsis ve septik şok patojenezinde rol aldığı bilinen en etkili mikrobiyel araçtır (1).

E. coli enfeksiyonlarında yapılan çalışmalarda genel olarak Th1 ve Th17 yanıtı ve proinflamatuvar sitokin konsantrasyonları kontrol gruplarından daha yüksek olarak bildirilmiştir (91, 142-144).

Sığır nötrofil hücre kültürü ile in vitro yapılan bir çalışmada LPS ile stimüle edilen hücrelerde TNF- α , IFN- γ , IL-1 β ve IL-12 sekresyonunda artış olduğu bildirilmiştir (142). Ayrıca E. coli ile enfekte meme bezlerinde IL-17 ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (143).

E. coli ile enfekte edilen farelerin serum IL-6 ve IFN- γ düzeylerinde artış olduğu, buna karşın TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-10 ve IL-12 düzeylerinde istatistiksel olarak farklılık olmadığı bildirilmiştir (144).

LPS tarafından aktive edilen Mitogen-activated protein kinase (MAP kinase), TNF- α ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretiminde görevli bir protein kinazdır. Mitogen-activated protein kinase phosphatase (MKP)'ler MAP kinazları inaktive eder ve böylece LPS tarafından uyarılan proinflamatuvar yanıtı baskılar. In vitro monosit ve makrofaj hücre kültürlerine LPS eklenerek yapılan bir çalışmada ortama Vitamin D eklendiğinde MKP-1 ekspresyonunda önemli seviyede artış olduğu ve buna bağlı olarak TNF- α ve IL-6 üretiminin inhibe olduğu bildirilmiştir (91).

LPS ile uyarılan farklı hücre kültürlerinde yapılan in vitro bir çalışmada D vitamininin hücre türüne göre farklı etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada LPS ile uyarılan nötrofillerde TNF- α ve IL-6 sentezinde LPS eklenmeyen kontrol

grubuna oranla artış olduğu ve 1,25-D'nin bu sitokinlerinlerin üretiminde bir farklılığa neden olmadığı bildirilmiştir. Ayrıca ne LPS ne de 1,25-D nötrofillerde IL-1 β üretiminde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmuştur. LPS ile uyarılan makrofajlarda ise IL-1 β , IL-6 ve TNF- α üretiminde artış olduğu ve 1,25-D'nin IL-6 ve TNF- α üretiminde istatistiksel bir farklılığa neden olmadığı ancak hem LPS ile uyarılan hücrelerde hem de kontrol grubunda IL-1 β üretimini arttırdığı bildirilmiştir. LPS ve/veya 1,25-D'nin nötrofillerin fagositoz kapasitesinde bir değişikliğe neden olmadığı; buna karşın LPS ve 1,25-D kombinasyonunun makrofajların fagositoz kapasitesini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (145).

3.3.2. Rotavirüs İshalleri

Rotavirüs buzağılarda ilk tespit edilen viral diyare etkenlerinden biridir ve bu nedenle önceleri neonatal buzağı diyare virüsü olarak adlandırılmıştır (134). Reoviridae ailesinden olan rotavirüslerin antijenik özellikleri bakımından A-H olmak üzere 8 farklı alt grubu bulunmaktadır. Bunların arasında Grup A rotavirüs klinik olarak en yaygın olanıdır (146).

Rotavirüs, neonatal buzağı ishallerinin etiyolojisinde en sık olarak görülen patojenlerden biridir. Genellikle 5-14 günlük buzağılarda görülür ancak bazen ilk 24 saat içinde bile görülebilmektedir (135). Virüs 12-24 saat gibi kısa bir inkübasyon süresinden sonra perakut diyare oluşturur (1).

Rotavirüs geniş bir pH aralığında stabil kalabilir. Ayrıca süt gastrointestinal kanalın olumsuz koşullarına karşı tampon aktivitesi gösterir (147). Rotavirüs oral yolla alındıktan sonra ilk olarak duodenal enterositleri enfekte eder ve proksimalden distale doğru ilerleyerek diğer ince bağırsak bölümlerine yerleşir.

Enfekte enterositler virionlar tarafından parçalanır ve bu hücrelerin yerini henüz olgunlaşmamış hücreler alır. Bu olgunlaşmamış hücrelerin absorpsiyon kapasitesi ve laktaz gibi birçok enzimatik aktivitesi yetersizdir. Bunun sonucu olarak bağırsaklardan glikoz, HCO_3 , Na, Cl, K ve su atılır. Ayrıca bağırsaklarda biriken sütun mikrobiyal fermentasyonu sonucu laktik asit artışı şekillenir (148).

Rotavirüsün primer olarak villöz atrofi ve malabsorbtif diyare oluşturduğu düşünülmektedir (149). Ancak toksin aracılı sekresyon artışının da rotavirüs diyarelerinin patojenezinde rolünün olduğunu gösteren bulgular vardır (134).

Nonstructural glycoprotein 4 (NSP4) toksin kaynaklı patojenik etkilere yol açtığı düşünülen bir rotavirüs proteinidir. NSP4, disakkaridazların hücre içinden bağırsak lumenine geçişini inhibe ederek karbonhidratların sindirimini azaltıp maldigestif diyareye sebep olur. Ayrıca direkt olarak Na glikoz taşıyıcıların aktivitesini inhibe ederek glikoz ve su absorpsiyonunu azaltır (134).

3.3.2.1. Rotavirüs Enfeksiyonlarında İmmün Yanıt

Vücudun rotaviral enfeksiyonlara karşı savunulmasında hem doğal hem de kazanılmış immün yanıt gereklidir.

Doğal bağışıklık sisteminin bir komponenti olan kollektinler bazı bakteri ve virüslere bağlanarak fagositik hücreler tarafından fagosit edilmelerini destekleyen antimikrobiyal proteinlerdir. İn vitro olarak kollektinlerin rotavirüsü nötralize ettiği ve antiviral etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (150).

Kazanılmış immün yanıtta B hücreleri rotavirüs için spesifik IgA ve IgG antikorları üretir. CD4^+ yardımcı T hücreleri ürettiği sitokinler aracılığı ile bu sürece katkıda bulunur. CD8^+ sitotoksik T hücreleri ise rotavirüsün direkt olarak yok edilmesini sağladığı için kritik önemdedir (147).

Rotavirüs enfeksiyonlarına karşı hem Th1 hem de Th2 immün yanıtın önemli rollerinin bulunduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Domuzlarda rotavirüs ile oluşturulan diyare modelinde serum IL-6 düzeyinin arttığı bildirilmiştir (151). Oral anti-IL-10 antikoru verilen buzağılarda kontrol grubuna oranla fekal rotavirüs saçılma prevalansının arttığı gözlenmiştir (152). Başka bir çalışmada rotavirüs inoküle edilen ratların duodenum, jejenum ve ileumlarında IL-2, IL-10, TNF- α ve IFN- γ sentezinin arttığı bildirilmiştir (153).

D vitamininin rotavirüs enfeksiyonlarına karşı savunmada önemli olduğu hem in vitro hem de in vivo olarak gösterilmiştir. Rotavirüs ile enfekte edilen intestinal epitelyal hücre kültüründe CYP27B1 sentezinde artış olduğu ve fizyolojik konsantrasyonlardaki 25-D'nin bu hücrelerde rotavirüs replikasyonunu sınırladığı bildirilmiştir. Araştırmacılar D vitamininin bu koruyucu etkisinin retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-1) mekanizması ile oluştuğunu göstermiştir (154). Aynı araştırmacıların domuzlar üzerinde yaptığı in vivo bir çalışmada domuzlar iki gruba ayrılarak düşük (200 IU) ve yüksek (5000 IU) düzeyde D vitamini bulunan iki farklı rasyon ile bir hafta beslenmiş, sekizinci gün oral yolla rotavirüs ile enfekte edilmiştir. Enfeksiyondan sonra yüksek D vitamini grubunun bağırsaklarında villusların yüksekliğinin ve kriptlerin derinliğinin düşük D vitamini grubuna göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yüksek D vitamini grubunda günlük canlı ağırlık artışının, günlük yem tüketiminin ve yemden yararlanma oranının, düşük D vitamini grubuna oranla daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Düşük D vitamini grubundaki domuzların serum IL-2, IL-6 ve IFN- β düzeylerinin yüksek D vitamini grubuna oranla önemli düzeyde daha yüksek olduğu bildirilmiştir (155).

Ayrıca rotaviral diyareli çocukların serum 25-D düzeylerinin sağlıklı çocuklara oranla önemli düzeyde düşük bulunmuş olması (156) da D vitamininin rotavirüs enfeksiyonlarına karşı önemini ortaya koymaktadır.

3.3.3. Koronavirüs İshalleri

Koronavirüs alfa, beta ve gamma olmak üzere en az üç alt sınıfa ayrılmaktadır (157). Bovine Corona Virüs (BCoV) ve Human Coronavirus (HCoV) betacoronavirus alt sınıfında yer almaktadır (158). BCoV tek sarmallı, genetik materyal olarak RNA bulunduran zarflı bir virüstür (159). Koronavirüs pneumoenteric bir virüstür ve sığırlarda neonatal diyarenin dışında kış dizanterisi ve solunum yolu hastalıklarının oluşumuna da neden olabilir (160, 161).

Koronavirüslerde hemagglutinin-esterase protein (HE), spike glycoprotein (S), small membrane protein (E), membrane protein (M) ve nucleocapsid protein (N) olarak adlandırılan beş adet major yapısal protein bulunur. Bunlardan S ve HE proteinleri virüsün hücre içine girmesinde ve virüse karşı immün yanıt oluşturulmasında önemlidir (159). S protein S1 ve S2 alt ünitelerinden oluşur. Periferik bir protein olan S1 virüsün konakçı hücre reseptörlerine bağlanmasında, hemagglutinasyon aktivitesinde ve antiviral antikor sentezinin uyarılmasında rol alır. S2 virüsün ve konakçı hücre membranlarının füzyonunda görevlidir (158).

Koronavirüs ishalleri genelde 5-30 günlük buzağılarda görülmekte ve 7-10. günlerde pik yapmaktadır (162). Koronavirüs hem ishalleri hem de sağlıklı buzağıkların dışkılarında bulunabilir. Ancak ishalleri buzağılarda insidans % 8-69 arasında iken sağlıklı buzağılarda % 0-24 arasında olduğu bildirilmiştir (161).

Rotavirüs ve C. parvum diyarelerinde olduğu gibi Koronavirüs diyareleri de malabsorpsiyon ve maldigesyon sebebi ile oluşmaktadır. Koronavirüs primer olarak villöz epitelyal hücreleri hedef almaktadır. Ancak kript enterositler ve kolonositler de koronavirüs tarafından etkilenebilmektedir. Bundan dolayı genellikle koronavirüs diyarelerinde klinik belirtiler daha uzun süre devam eder (134).

Buzağılarda deneysel olarak oluşturulan enfeksiyon modelinde klinik belirtiler ortadan kalktıktan aylar sonra bile PCR aracılığıyla plazma ve nazal sekresyonlarda viral RNA tespit edildiği bildirilmiştir (163).

Koronavirüs ve rotavirüs diyareleri epidemiyolojik ve patofizyolojik bakımdan çakışmaktadır (134), ancak koronavirüs diyareleri hem ince hem kalın bağırsakları etkilediğinden rotaviral diyareye göre klinik olarak genellikle daha ciddi hastalık tablosu ve daha yüksek mortalite ile karakterizedir (139, 161).

3.3.3.1. Koronavirüs Enfeksiyonlarında İmmün Yanıt

Koronavirüs türler arası transmisyon yönünden büyük bir potansiyele sahiptir ve bazen insanlarda da salgın hastalıklara sebep olabilmektedir (158). Koronavirüs diyareli buzağılardan alınan örneklerden S protein gen analizi ile yapılan bir çalışmada BCoV ve HCoV arasında yüksek düzeyde benzerlik olduğu bildirilmiştir (158).

İnsanlarda 2019 yılında tespit edilen ve yeni tip koronavirüs (COVID-19) olarak adlandırılan hastalığın patojenezinde immün sistemin aşırı aktivasyonu sonucu immün yanıtın proinflatuvar olan Th1 yönüne kaymasından kaynaklanan sitokin fırtınası fenomeninin rolü olduğu ortaya konulmuştur.

D vitamininin immün yanıtı Th1'den Th2'ye yönlendirdiği bilindiği için (164), bu bilgiden hareketle günümüzde D vitamini ve COVID-19 arasındaki ilişki yoğun olarak araştırılmaktadır.

Düşük serum D vitamini düzeyinin hastalık riskini, hastalığın şiddetini ve mortalitesini arttırdığını bildiren çalışmalar (165-167) olduğu gibi D vitamini ile COVID-19 hastalığı arasında ilişki bulunmadığını bildiren (168, 169) çalışmalar da mevcuttur ve bu ilişki henüz tam olarak anlaşılabilmiş değildir.

Koronavirüs enfeksiyonlarına karşı gastrointestinal mukozal yüzeyde lokal immün yanıt önemli bir yer tutar. Buzağılar doğumdan sonraki ilk birkaç haftalık dönemde kolostral immünglobulin G (IgG) tarafından sağlanan pasif bağışıklığa bağımlıdır. Daha sonraki dönemde aktif bağışıklığın bir formu olarak sekretorik immünglobulin A (IgA) sentezi başlar (170).

3.3.4. C. parvum İshalleri

C. parvum birçok ülkede neonatal buzağı ishallerinde en sık rastlanan etkenlerden biridir (136, 171). Ana konakçısı buzağılar olan bu protozoon insanlarda da ishale sebep olabilmektedir (171, 172). Sığırlarda yapılan bir çalışmada doğumdan itibaren 24 aylık yaşa kadar fekal örnekler C. parvum yönünden araştırılmıştır. 2 haftalık buzağının % 96,6'sı pozitif bulunmuş ve buzağının yaşı ilerledikçe bu oranın düştüğü bildirilmiştir (173).

Sığırlarda en sık olarak C. parvum, C. bovis, C. ryanae ve C. andersoni türlerine rastlanır. C. andersoni daha çok yetişkin sığırların abomazumunda enfeksiyon oluşturur. C. bovis, C. ryanae türleri sığırlarda klinik olarak hastalık oluşturmaz (171).

C. parvum diyareleri genelde 5-28 günlük buzağılarda görülür. Cryptosporidium ookistleri fekal-oral yol ile alındıktan sonra genelde 3-4 gün içinde maldigesyon, malabsorbsiyon ve ozmotik etkiler sebebi ile diyare oluşturur (139, 171).

C. parvum eksistasyon (enfektif sporozoitlerin serbestleşmesi), merogoni (konakçı hücre içinde eşeysiz çoğalma), gametogoni (mikro ve makrogamet oluşumu), fertilizasyon (mikro ve makro gametlerin birleşmesi), ookist duvarı oluşumu (bir konakçıdan diğerine bulaşan dış ortam şartlarına dirençli form) ve sporogoni (enfektif sporozoitlerin oluşumu) olarak isimlendirilen ve tek bir konakçının gastrointestinal sisteminde tamamlanan altı adet major gelişme aşaması olan kompleks bir yaşam döngüsüne sahiptir (174). Sporozoitler bağırsak lumenine ya ince duvarlı ya da kalın duvarlı ookist şeklinde salınabilir. İnce duvarlı ookistler konakçıyı tekrar (re-enfeksiyon, otoenfeksiyon) enfekte edebilmektedir. C. parvum bu “oto-enfeksiyon” oluşturabilme yeteneği sayesinde kısa süre içinde yüksek miktarda yeni ookist oluşturabilir ve bazen 1-2 hafta boyunca devam eden diyarelere sebep olabilir (171).

3.3.4.1. C. parvum Enfeksiyonlarında İmmün Yanıt

C. parvum enfeksiyonuna karşı savunmada hem doğal hem de kazanılmış immünitinin önemini gösteren çalışmalar bulunmaktadır.

Doğal bağışıklıkta görevli TLR'ler enterositlerde homeostazın devamlılığını sağlayarak ve inflamasyonu uyararak mukozal yüzeyin korunmasında rol alır.

Farelerde in vivo yapılan bir çalışmada TLR4 geni bulundurmeyan farelerde *C. parvum* enfeksiyonu daha uzun süre devam etmiştir (175). Ayrıca *C. parvum* enfeksiyonlarına karşı savunmada nitrik oksit önemli olduğu gösterilmiştir (176).

C. parvum enfeksiyonlarına karşı kazanılmış bağışıklık yanıtında IFN- γ başta olmak üzere Th1 sitokinlerinin önemli rolü olduğu düşünülmektedir. IFN- γ knock-out farelerin *C. parvum* enfeksiyonlarına daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (177). Farelerde oluşturulan bir *C. parvum* enfeksiyon modelinde *C. parvum* ookistleri inokule edilmeden önce eksojen IL-12 uygulanan farelerde enfeksiyon oluşmadığı veya enfeksiyonun şiddetinin daha az olduğu bildirilmiştir. IL-12'nin bu etkisinin IFN- γ sentezini arttırmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı çalışmada IL-12'nin bu koruyucu etkisinin anti-IFN- γ antikoru verildiğinde tamamen bloke olduğu gösterilmiştir (178).

Barakat ve ark. (179) NK hücrelerinin *C. parvum* enfeksiyonundaki rolünü araştırmak amacıyla iki farklı fare grubuna oral *C. parvum* ookistleri vererek deneysel enfeksiyon modeli oluşturmuştur. Birinci grup T ve B lenfositlerden yoksun farelerden, ikinci grup T lenfositleri, B lenfositleri ve NK hücrelerinden yoksun olan farelerden oluşturulmuştur. Çalışmanın sonunda NK hücrelerinden yoksun olan grupta bulunan farelerin tamamının öldüğü ancak NK hücreleri bulunduran farelerin hiçbirinin ölmediği bildirilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada anti-IFN- γ uygulandığında her iki denek grubunda enfeksiyonun şiddetinin arttığı gözlenmiştir. Bu sonuçlara dayanılarak *C. parvum* enfeksiyonuna karşı immün yanıtta IFN- γ 'nın önemli rolü olduğu ve NK hücrelerinin IFN- γ sentezlemenin yanında başka görevlerinin de olabileceği bildirilmiştir.

Campbell ve ark. (180) IL-4 veya IL-10 bulundurmeyen farelere *C. parvum* ookistleri inoküle edildiğinde enfeksiyon oluşmadığını, buna karşın IL-12 bulundurmeyen farelerde enfeksiyon oluştuğunu bildirmiştir. Buna karşın Raabis ve ark. (152) buzağılara oral yolla anti-IL-10 antikoru verildiğinde *C. parvum* prevalansında bir değişiklik olmadığını bildirmiştir.

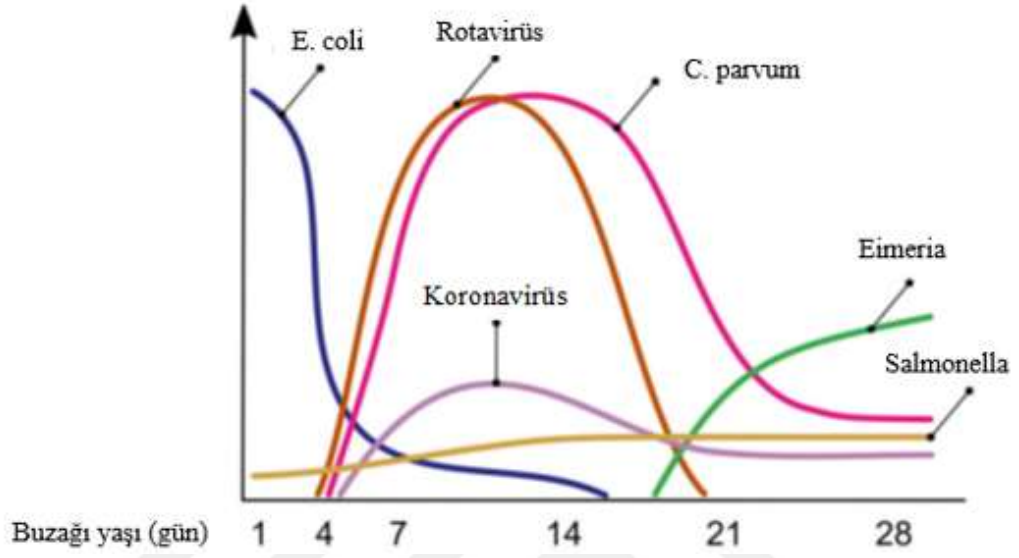
C. parvum enfeksiyonlarında Th1/Th2 sitokinlerini araştırmak için Li ve ark. (181) oral *C. parvum* ookistleri verilerek enfekte edilen buzağılar üzerinde deneysel bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada Th1 ve Th2 immün yanıtın değerlendirilmesinde sırasıyla IFN- γ ve IL-4 kullanılmıştır. Serum IFN- γ /IL-4 oranının enfeksiyondan sonraki 3. günden itibaren artmaya başladığı ve gaita ile ookist saçılımının maksimum düzeye ulaştığı 6. gün IFN- γ /IL-4 oranının pik yaptığı bildirilmiştir.

C. parvum ile enfekte edilen farelerin kontrol grubuna oranla daha yüksek düzeyde IL-17, IL-6 ve TNF- α ürettikleri bildirilmiştir (182). *C. parvum* ile enfekte insanların jejunum biyopsilerinde TNF- α düzeyinin arttığı bildirilmiştir (183). In vitro yapılan bir çalışmada, TNF- α eklenen fare enterosit hücre kültürlerinde *C. parvum* gelişiminin kontrol grubuna göre önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (184).

Sığır jejunum biyopsi materyali ile yapılan bir *C. parvum* enfeksiyon modelinde IL-17 düzeyinde önemli düzeyde artış olduğu bildirilmiştir (185).

Deneysel olarak iyileşen ve iyileşmeyen olmak üzere iki farklı fare grubu ile oluşturulan *C. parvum* enfeksiyon modelinde, iyileşmeyen grup olarak IFN- γ knock-out fareler kullanılmıştır. İyileşmeyen fare grubunda IFN- γ üretiminin olmadığı; iyileşen gruptaki farelere oranla daha düşük düzeyde IL-2, IL-4 ve daha

yüksek düzeyde IL-5, IL-6 ve IL-10 üretildiği bildirilmiştir. Bu sonuçlar C. parvum enfeksiyonuna karşı savunmada hem Th1 hem Th2 immün yanıtın gerekli olduğunu göstermektedir (186).



Şekil 3. Buzağılarda patojenik etkenlerin görülme sıklığının yaşı göre dağılımı (187).

4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. Çalışma Materyali (Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması)

Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'nın 30.04.2019 tarih ve 104 Karar No'lu Etik Kurul Kararı ile onaylanmıştır.

Çalışmada hasta ve kontrol grupları olmak üzere 2 grupta toplam 40 adet buzağı kullanıldı. Çalışmanın hasta grubunu Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi İç Hastalıkları Kliniği'ne tanı ve tedavileri için getirilen neonatal dönemdeki (doğumdan sonraki ilk 28 gün) 32 adet neonatal ishelli buzağı oluşturdu. Hasta grubu ishale neden olan patojene göre her grupta 8 buzağı olacak şekilde, 4 gruba (E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs ve C. parvum grupları) ayrıldı. Kontrol grubu ise aynı dönemdeki klinik olarak sağlıklı olduğu belirlenen 8 adet buzağıdan oluşturuldu.

4.2. Klinik Muayeneler ve Örneklerin Toplanması

Çalışmada kullanılan tüm hayvanların klinik muayeneleri iç hastalıkları muayene şemasına uygun olarak yapıldı. Klinik muayenelerde buzağıkların neonatal dönem (doğumdan sonraki ilk 28 gün) yaş aralığında olmasına, doğumdan sonraki ilk 24 saat içinde canlı ağırlığının en az %10'u kadar kolostrum almış olmasına, doğumdan sonra D vitamini enjeksiyonu yapılmamış olmasına, herhangi bir ilaç (antibiyotik, antiinflamatuvar uygulanması vb.) ve süplementasyon yapılmamış olmasına özellikle dikkat edildi. Kontrol grubunu oluşturan buzağıkların klinik muayenelerinden elde edilen tüm bulguların sağlıklı hayvanlar için bildirilen fizyolojik sınırlar içerisinde olmasına dikkat edildi.

Klinik muayenelerde ishalleri olduğu belirlenen (hasta grubu) neonatal buzağılardan usulüne uygun olarak steril kaplar içerisinde gaita örnekleri toplandı. Gaita örnekleri alınır alınmaz hızlı test kitleri ile patojenik etken analizlerinin yapılmasında kullanıldı.

Çalışmaya alınan tüm buzağların v. jugularislerinden potasyum EDTA içeren tüplere (Ayset, Türkiye) ve antikoagülanlı jelli tüplere (Ayset, Türkiye) kan örnekleri alındı. Potasyum EDTA'lı kan örnekleri hemen hematolojik muayeneler total protein ve fibrinojen analizleri için kullanıldı. Antikoagülanlı tüplere alınan kan örnekleri pıhtılaştıktan sonra soğutmalı santrifüjde 2000 g'de 15 dakika santrifüje edilerek serum örnekleri elde edildi. Serum örnekleri 100 µL'lik porsiyonlara bölünerek plastik tüplere konuldu. Bu serum örnekleri D vitamini metabolitleri ve ELISA analizleri yapılana kadar -80 °C'de saklandı.

4.3. Patojenik Etkenlerin Belirlenmesi

Hasta grubunda patojenik etkenin belirlenmesinde hızlı test kiti (Rainbow Calf Scours-Bio K 306 Bio-X Diagnostics, Belçika) kullanıldı. Bu test kiti (Şekil 4) E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Clostridium antikorlarını içeren beş farklı stripten oluşmaktadır. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda gaita örnekleri test kitinde bulunan solüsyonla karıştırıldıktan sonra striptlerin bulunduğu tüpe aktarıldı. 10 dakika beklendikten sonra okuma yapıldı. Tek çizgi bulunanlar negatif, çift çizgiler pozitif olarak değerlendirildi. Birden fazla patojenik etken ile enfekte buzağlar çalışmaya dahil edilmedi.



Şekil 4: Etiyolojik tanıda kullanılan hızlı test kiti

4.4. Hematokrit ve Total lökosit (WBC) Ölçümleri

Alınan her bir EDTA'lı kan örneğinden mikrohematokrit kılcal tüplere (Marienfield, Almanya) kan alınıp 14000 devirde 5 dakika santrifüj edilerek hematokrit değerler ölçüldü.

WBC sayımı manuel olarak Thoma lamı kullanılarak yapıldı.

4.5. Total Protein ve Fibrinojen Analizleri

Total proteinin ölçümü amacıyla, mikrohematokrit değer ölçüldükten sonra kılcal tüplerinden biri plazma kısmından kırıldı ve 1 damla plazma refraktometreye damlatılarak total protein konsantrasyonu g/dl olarak belirlendi.

Fibrinojen değerini belirlemek için literatürde belirtildiği şekilde (188) diğer kılcal tüp sıcak su banyosunda 57 °C'de 3 dakika bekletildikten sonra tekrar 5 dakika santrifüj edildi ve plazma kısmından kırılıp refraktometreye 1 damla damlatıldı. Refraktometrede okunan ilk değerden ikinci değer çıkarılarak fibrinojen değeri elde edildi.

4.5.1. Serum 25-D ve 1,25-D Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Serum 25-D ve 1,25-D konsantrasyonlarının analizi sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile gerçekleştirildi.

4.5.2. Serum Sitokin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Serum TNF- α (CSB-E12020B), IFN- γ (CSB-E09812b), IL-1 β (CSB-E12986B), IL-2 (CSB-E09810b), IL-4 (CSB-E12898B), IL-5 (CSB-E12897B), IL-6 (CSB-E12899B), IL-10 (CSB-E12917B), IL-12 (CSB-E14010B), IL-17 (CSB-E14207B) sitokin konsantrasyonlarını belirlemede tür spesifik ticari ELISA kitleri (Cusabio, Wuhan, Çin) kullanıldı. Serum IL-13 düzeyleri tür spesifik ticari ELISA kiti (GR112003) (Genorise Nori Bovine IL-13, ABD) ile belirlendi. ELISA testleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Dalga boyu ölçümleri ELISA okuyucu (Biotek ELx800, Fisher Scientific, ABD) ile gerçekleştirildi.

4.6. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS 22 (Statistical Package for the Social Sciences for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) programı kullanılarak yapıldı. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi ile analiz edildi. Gruplar arasındaki istatistiksel farklılık Kruskal Wallis testi ile incelendi. İstatistiksel farklılık için sınır değeri 0,05 olarak kabul edildi. Ortancalar arasında istatistiksel farklılık bulunan değişkenlerde farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını saptamak için Mann Whitney U testi ile ikili grup karşılaştırmaları yapıldı. D vitamini metabolitleri ile sitokinler arasındaki korelasyon Spearman testi ile analiz edildi.

5. BULGULAR

5.1. Klinik Muayene Bulguları

E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol gruplarındaki buzağuların vücut sıcaklıkları (°C) ve kalp frekanslarının (atım/dk) bireysel değerleri Tablo 1’de verilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık belirlenmemiştir (Tablo 2).

5.2. Hematokrit, WBC, Total Protein ve Fibrinojen Ölçümü Bulguları

E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol gruplarındaki buzağuların hematokrit, WBC, total protein ve fibrinojen değerleri sırasıyla Tablo 3, Tablo 4, Tablo 5, Tablo 6 ve Tablo 7’de verilmiştir.

E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol gruplarının hematokrit, WBC, total protein ve fibrinojen değerlerinin ortancaları, değer aralıkları ve gruplar arasındaki farklılığın istatistiksel önemi Tablo 8’de verilmiştir.

Hematokrit, WBC ve total protein değerlerinde gruplar arasında istatistiksel bir farklılık belirlenmemiştir (Tablo 8). Fibrinojen konsantrasyonu Koronavirüs grubunda Kontrol grubuna ($p=0,029$) göre; C. parvum grubunda Kontrol grubuna ($p=0,002$) ve E. coli grubuna ($p=0,008$) göre; Rotavirüs grubunda ise Kontrol grubuna oranla ($p=0,016$) istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur (Tablo 8).

5.3. Serum Biyokimyasal Muayene Bulguları

5.3.1. Serum 25-D ve 1,25-D Analizi Bulguları

E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol gruplarındaki buzağuların serum 25-D ve 1,25-D düzeyleri Tablo 9’da verilmiştir.

E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol gruplarının 25-D ve 1,25-D düzeylerinin ortancaları, değer aralıkları ve gruplar arasındaki farklılığın istatistiksel önemi Tablo 10’da gösterilmiştir.

Serum 25-D düzeyleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir (Tablo 10).

Serum 1,25-D düzeyinin E. coli grubunda Kontrol ($p=0,021$) ve C. parvum ($p=0,036$) gruplarına oranla; Koronavirüs grubunda ise C. parvum ($p=0,021$) ve Kontrol ($p=0,012$) gruplarına oranla istatistiksel olarak önemli ölçüde daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Tablo 10).

5.3.2. Serum Sitokin Analizi Bulguları

E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol gruplarındaki buzağuların serum sitokin konsantrasyonları sırasıyla Tablo 11, Tablo 12, Tablo 13, Tablo 14 ve Tablo 15’de verilmiştir.

E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol gruplarının serum sitokin düzeylerinin ortancaları, değer aralıkları ve gruplar arasındaki farklılığın istatistiksel önemi Tablo 16’da gösterilmiştir.

TNF- α düzeyinin, E. coli grubunda Kontrol grubuna göre farklılık göstermediği ancak Rotavirüs ($p=0,027$), Koronavirüs ($p=0,021$) ve C. parvum ($p=0,027$) gruplarına göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Rotavirüs ($p=0,007$), Koronavirüs ($p=0,027$) ve *C. parvum* ($p=0,016$) gruplarının TNF- α konsantrasyonları ise Kontrol grubuna oranla daha düşük olarak bulunmuştur.

IFN- γ konsantrasyonu, *E. coli* grubunda hem Kontrol ($p=0,006$) hem de Rotavirüs ($p=0,009$), Koronavirüs ($p=0,018$) ve *C. parvum* ($p=0,002$) gruplarından istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur.

IL-1 β konsantrasyonu, *E. coli* grubunda hem Kontrol ($p=0,013$) hem de Rotavirüs ($p=0,006$), Koronavirüs ($p=0,016$) ve *C. parvum* ($p=0,006$) gruplarından istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur

IL-2 konsantrasyonunun, *E. coli* grubunda hem Kontrol ($p=0,031$) hem de Rotavirüs ($p=0,027$), Koronavirüs ($p=0,02$) ve *C. parvum* ($p=0,013$) gruplarından istatistiksel olarak daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

IL-4 konsantrasyonu, istatistiksel olarak *E. coli* grubunda hem Kontrol ($p=0,01$) hem de Rotavirüs ($p=0,004$), Koronavirüs ($p=0,004$) ve *C. parvum* ($p=0,035$) gruplarından daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca *C. parvum* grubunun IL-4 düzeyinin Rotavirüs grubundan istatistiksel olarak daha yüksek ($p=0,044$) olduğu belirlenmiştir.

IL-5 düzeyi, *E. coli* grubunda istatistiksel olarak hem Kontrol ($p=0,027$) hem de Rotavirüs ($p=0,009$), Koronavirüs ($p=0,021$) ve *C. parvum* ($p=0,008$) gruplarından daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca Rotavirüs grubunun IL-5 düzeyi *C. parvum* grubundan önemli ölçüde yüksekken, *C. parvum* grubunun IL-5 düzeyi Kontrol grubuna ($p=0,011$) göre önemli düzeyde daha düşük olarak bulunmuştur.

IL-6 düzeyinin E. coli grubunda Kontrol grubuna göre önemli bir farklılık göstermediği ancak Rotavirüs ($p=0,046$), Koronavirüs ($p=0,046$) ve C. parvum ($p=0,046$) gruplarından istatistiksel olarak daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca Rotavirüs ($p=0,027$) ve C. parvum ($p=0,046$) gruplarının IL-6 düzeyi Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak düşük bulunmuştur.

IL-10 düzeyinin E. coli grubunda Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir farklılık göstermediği ancak Rotavirüs ($p=0,046$) ve C. parvum ($p=0,012$) gruplarına göre önemli düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir. Rotavirüs ($p=0,036$) grubunun IL-10 düzeyi Kontrol grubuna göre önemli düzeyde daha düşük belirlenmiştir.

IL-12 konsantrasyonunun, E. coli grubunda hem Kontrol ($p=0,004$) hem de Koronavirüs ($p=0,031$) ve C. parvum ($p=0,006$) gruplarından daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Rotavirüs grubunun IL-12 konsantrasyonunun, Kontrol ($p=0,006$) ve C. parvum ($p=0,003$) gruplarından istatistiksel olarak daha yüksek olduğu; Koronavirüs grubunun IL-12 konsantrasyonunun ise Kontrol ($p=0,017$) ve C. parvum ($p=0,018$) gruplarından daha yüksek olduğu görülmüştür.

IL-13 konsantrasyonları yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık ($p>0,05$) saptanmamıştır.

IL-17 konsantrasyonu, E. coli grubunda hem Kontrol ($p=0,010$) hem de Rotavirüs ($p=0,024$), Koronavirüs ($p=0,006$) ve C. parvum ($p=0,003$) gruplarından istatistiksel olarak daha yüksek olarak belirlenmiştir.

5.3.3. Korelasyon Analizi Bulguları

Rotavirüs grubunda serum D vitamini metabolitleri konsantrasyonları ile sitokin konsantrasyonları arasında bir ilişki olup olmadığını ortaya koymak için yapılan Spearman testi 25-D ile IFN- γ arasında negatif yönde korelasyon olduğunu göstermektedir ($r = -0,874$, $p = 0,005$).

Koronavirüs grubunda serum D vitamini metabolitleri konsantrasyonları ile sitokin konsantrasyonları arasında bir ilişki olup olmadığını ortaya koymak için yapılan Spearman testi 1,25-D ile IL-2 arasında negatif yönde korelasyon olduğunu göstermektedir ($r = -0,927$, $p = 0,001$).

C. parvum grubunda serum D vitamini metabolitleri konsantrasyonları ile sitokin konsantrasyonları arasında bir ilişki olup olmadığını ortaya koymak için yapılan Spearman testi 25-D ile IL-6 ($r = 0,786$, $p = 0,021$), 25-D ile IL-10 ($r = 0,714$, $p = 0,047$) arasında pozitif yönde; 25-D ile IL-17 ($r = -0,779$, $p = 0,023$) arasında ise negatif yönde korelasyon olduğunu göstermektedir.

5.4. Tablolar

Tablo 1. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, ve C. parvum ve Kontrol grubu buzağuların kalp frekansı (P) (atım/dk) ve vücut sıcaklığı (T) (°C) değerleri.

		Kayıt No:							
		1	2	3	4	5	6	7	8
E. coli	P	160	162	120	240	164	120	200	160
	T	40,4	38,2	38,6	38,7	35,7	39	40,8	39,5
Rotavirüs	P	138	132	134	164	88	128	168	152
	T	37,8	38,2	38,6	39,8	34	38,9	39,4	39,6
Koronavirüs	P	120	156	160	90	94	84	158	96
	T	38,3	35,8	39,4	32,3	34,1	36,8	39,4	32,5
C. parvum	P	120	116	144	112	84	144	118	96
	T	38	37,6	40	39,5	39,2	39,4	39	39
Kontrol	P	96	108	112	128	124	88	132	132
	T	38,3	38,3	37,9	38,3	38,3	38,4	38,1	38,8

Tablo 2. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağuların vücut sıcaklığı (T) (°C) ve kalp frekansı (P) (atım/dk) değerlerinin ortancaları, değer aralığı ve gruplar arasındaki farklılığın önemi.

	Gruplar					p
	E. coli	Rotavirüs	Koronavirüs	C. parvum	Kontrol	
T (°C)	38,9(35,7-40,9)	38,8(34-39,8)	36,3(32,2-39,4)	39,1(37,6-40)	38,3(37,9-38,8)	0,100
P(atım/dk)	161(120-240)	136(88-168)	108(84-160)	117(84-144)	118(88-132)	0,209

Tablo 3. E. coli grubundaki buzağların hematokrit, total protein, WBC ve fibrinojen değerleri.

Kayıt No	Hematokrit (%)	Total Protein (g/dl)	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Fibrinojen (mg/dl)
E. coli 1	30	7,2	10,4	600
E. coli 2	36	6,8	2,1	600
E. coli 3	33	7,0	5,7	400
E. coli 4	49	7,4	16,8	400
E. coli 5	39	6,8	10,2	400
E. coli 6	50	9,6	18,4	400
E. coli 7	48	9,0	6,3	800
E. coli 8	38	7,4	6,8	200

Tablo 4. Rotavirüs grubundaki buzağların hematokrit, total protein, WBC ve fibrinojen değerleri.

Kayıt No	Hematokrit (%)	Total Protein (g/dl)	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Fibrinojen (mg/dl)
Rotavirüs 1	32	6,8	5,5	600
Rotavirüs 2	36	7,2	7,3	600
Rotavirüs 3	22	7,4	6,5	600
Rotavirüs 4	37	6,8	8,5	600
Rotavirüs 5	31	8,0	2,4	800
Rotavirüs 6	43	7,4	10,2	400
Rotavirüs 7	34	7,0	2,5	400
Rotavirüs 8	39	8,2	14,2	1000

Tablo 5. Koronavirüs grubundaki buzağların hematokrit, total protein, WBC ve fibrinojen değerleri.

Kayıt No	Hematokrit (%)	Total Protein (g/dl)	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Fibrinojen (mg/dl)
Koronavirüs 1	31	7,6	3	400
Koronavirüs 2	34	7,0	6,9	200
Koronavirüs 3	27	7,4	6,9	600
Koronavirüs 4	40	7,8	6,7	800
Koronavirüs 5	38	7,6	6,8	800
Koronavirüs 6	36	8,6	6,1	600
Koronavirüs 7	29	6,8	7,1	600
Koronavirüs 8	41	7,8	6,5	800

Tablo 6. C. parvum grubundaki buzağların hematokrit, total protein, WBC ve fibrinojen değerleri.

Kayıt No	Hematokrit (%)	Total Protein (g/dl)	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Fibrinojen (mg/dl)
C. parvum 1	24	7,2	9,2	800
C. parvum 2	41	7,6	11	600
C. parvum 3	29	6,8	4,9	600
C. parvum 4	30	8,4	9,1	800
C. parvum 5	45	7,4	9,1	1200
C. parvum 6	36	6,8	2,4	800
C. parvum 7	27	7,0	7,8	600
C. parvum 8	35	7,2	9,1	1200

Tablo 7. Kontrol grubundaki buzağların hematokrit, total protein, WBC ve fibrinojen değerleri.

Kayıt No	Hematokrit (%)	Total Protein (g/dl)	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Fibrinojen (mg/dl)
Kontrol 1	26	6,8	6,2	200
Kontrol 2	34	7,0	9	200
Kontrol 3	29	7,2	8,3	400
Kontrol 4	26	7,6	7,9	200
Kontrol 5	33	6,8	9	600
Kontrol 6	35	7,0	11	600
Kontrol 7	27	6,6	6,2	400
Kontrol 8	32	6,4	9,6	200

Tablo 8. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağuların hematokrit (Htc), total protein (TP), fibrinojen (Fb) ve WBC değerlerinin ortancaları, değer aralığı ve gruplar arasındaki farklılığın istatistiksel önemi.

	Gruplar					p
	E. coli	Rotavirüs	Koronavirüs	C. parvum	Kontrol	
Hct (%)	38,5 (30-50)	35,0 (22-43)	35,0 (27-41)	32,5 (24-45)	30,5 (26-41)	0,069
WBC (x10³/µL)	8,5 (2,1-18,4)	6,9 (2,4-14,2)	6,8 (3-7,1)	9,1 (2,4-11)	8,65 (6,2-11)	0,425
TP (g/dl)	7,3 (6,8-9,6)	7,3 (6,8-8,2)	7,6 (6,8-8,6)	7,2 (6,8-8,4)	6,9 (6,4-7,6)	0,150
Fb (mg/dl)	400 (200-800) ^b	600 (400-1000) ^a	600 (200-800) ^a	800 (600-1200) ^a	300 (200-600) ^b	0,004

a,b: Aynı satırdaki farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir (p<0,05).

Tablo 9. E.coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağuların serum 25-D (ng/ml) ve 1,25-D (pg/ml) düzeyleri.

		Grup				
Kayıt No		E. coli	Rotavirüs	Koronavirüs	C. parvum	Kontrol
1	25-D	6,78	2,5	5,99	5,71	9,88
	1,25-D	24,63	9,15	55,62	28,30	10,18
2	25-D	9,91	2,5	5,72	7,1	21,05
	1,25-D	78,69	34,39	25,57	12,56	14,70
3	25-D	2,51	4,1	15,79	5,28	16,24
	1,25-D	54,97	2,50	36,24	17,27	16,57
4	25-D	10,06	6,86	2,5	13,46	14,55
	1,25-D	26,56	21,86	12,48	16,77	8,41
5	25-D	7,89	2,97	5,12	10,42	5,74
	1,25-D	25,53	12,01	83,19	21,23	27,30
6	25-D	10,79	6,61	10,43	18,2	6,65
	1,25-D	16,54	84,82	30,57	46,61	15,28
7	25-D	6,53	12,65	16,35	6,63	5,76
	1,25-D	57,60	30,82	49,59	8,92	17,19
8	25-D	7,28	3,76	4,91	13,35	9,92
	1,25-D	46,04	5,06	74,74	8,95	28,01

Tablo 10. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağuların 25-D ve 1,25-D düzeylerinin ortancaları, değer aralığı ve gruplar arasındaki farklılığın istatistiksel önemi.

	Grup					p
	E. coli	Rotavirüs	Koronavirüs	C. parvum	Kontrol	
25-D (ng/ml)	7,59 (2,51-10,79)	3,93 (2,5-12,65)	5,68 (2,5-16,35)	8,76 (5,28-18,2)	9,90 (5,74-21,05)	0,097
1,25-D (pg/ml)	36,30 (16,54-78,69) ^a	16,94 (2,5-84,82) ^{ab}	42,92 (12,48-83,19) ^a	17,02 (8,92-46,61) ^b	15,93 (8,41-28,01) ^b	0,023

a,b: Aynı satırdaki farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir (p<0,05)

Tablo 11. E. coli grubundaki buzağların serum sitokin konsantrasyonları.

	SİTOKİNLER										
	TNF- α (ng/ml)	IFN- γ (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-5 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)	IL-13 (pg/ml)	IL-17 (pg/ml)
E. coli 1	0,230	8,399	55,068	10,082	53,732	4,552	11,435	14,547	13,152	85,45	29,510
E. coli 2	0,019	10,876	21,978	6,201	57,071	0,605	3,011	5,820	6,877	36,75	39,169
E. coli 3	0,609	32,930	246,610	22,086	99,038	9,739	31,143	35,749	13,152	93,15	94,451
E. coli 4	0,055	31,280	210,782	24,048	62,735	5,335	7,879	11,619	10,406	95,95	46,772
E. coli 5	0,224	92,126	118,472	45,664	111,935	9,680	11,175	15,594	35,399	101,4	73,973
E. coli 6	0,200	35,870	260,746	79,933	96,504	9,240	39,042	46,371	12,110	93,15	61,406
E. coli 7	0,083	32,180	82,563	44,210	162,668	9,720	7,006	10,002	22,651	156,15	30,373
E. coli 8	0,449	54,985	143,149	82,234	54,840	18,873	19,860	23,275	8,228	149,55	21,578

Tablo 12. Rotavirüs grubundaki buzağların serum sitokin konsantrasyonları

	SİTOKİNLER										
	TNF- α (ng/ml)	IFN- γ (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-5 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)	IL-13 (pg/ml)	IL-17 (pg/ml)
Rotavirüs 1	0,080	16,398	14,108	11,873	50,438	1,992	7,302	8,743	10,406	65,950	19,413
Rotavirüs 2	0,052	26,930	44,816	8,993	49,350	1,790	5,240	7,042	14,526	48,500	33,064
Rotavirüs 3	0,049	10,118	24,068	8,479	53,732	1,420	4,683	7,720	8,228	19,650	24,912
Rotavirüs 4	0,030	5,875	17,941	5,800	46,120	0,349	4,993	8,310	9,064	22,800	16,262
Rotavirüs 5	0,051	10,110	24,190	18,490	79,206	1,865	18,863	23,688	12,110	270,400	71,138
Rotavirüs 6	0,095	10,040	65,917	16,849	50,438	1,881	6,068	7,497	9,499	124,200	19,413
Rotavirüs 7	0,018	4,960	17,941	10,657	46,120	1,865	3,864	7,251	9,499	75,450	15,238
Rotavirüs 8	0,058	7,778	28,385	7,986	48,268	1,745	3,235	6,955	7,632	136,750	21,578

Tablo 13. Koronavirüs grubundaki buzağların serum sitokin konsantrasyonları.

	SİTOKİNLER										
	TNF- α (ng/ml)	IFN- γ (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-5 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)	IL-13 (pg/ml)	IL-17 (pg/ml)
Koronavirüs 1	0,091	10,876	121,888	6,619	51,531	0,911	6,856	9,520	9,947	10,900	17,299
Koronavirüs 2	0,155	53,587	52,449	8,002	50,438	0,560	10,058	15,630	10,878	90,650	17,299
Koronavirüs 3	0,014	5,403	14,108	7,056	49,350	0,554	4,304	5,905	8,228	22,800	18,349
Koronavirüs 4	0,049	23,189	14,290	21,147	53,732	8,725	5,495	9,085	7,828	52,650	22,678
Koronavirüs 5	0,045	5,403	14,108	6,619	49,350	1,865	5,195	10,308	8,027	44,450	20,489
Koronavirüs 6	0,051	5,990	132,353	13,177	81,628	5,913	11,274	18,678	7,249	70,650	55,987
Koronavirüs 7	0,015	6,123	10,500	7,986	50,438	0,659	4,088	3,374	7,828	80,400	17,299
Koronavirüs 8	0,050	5,875	10,500	6,619	53,732	1,865	5,796	8,651	8,027	90,650	19,413

Tablo 14. C. parvum grubundaki buzağların serum sitokin konsantrasyonları.

	SİTOKİNLER										
	TNF- α (ng/ml)	IFN- γ (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-5 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)	IL-13 (pg/ml)	IL-17 (pg/ml)
C. parvum 1	0,041	5,178	12,274	8,479	50,438	0,911	4,735	6,016	6,167	29,500	22,678
C. parvum 2	0,045	7,481	37,531	5,800	51,531	0,507	4,106	5,608	6,516	5,750	22,678
C. parvum 3	0,042	7,778	47,322	11,254	62,735	0,716	3,761	5,643	7,249	36,750	22,678
C. parvum 4	0,050	7,420	28,385	8,690	54,840	0,911	7,129	7,967	7,632	205,850	20,420
C. parvum 5	0,134	7,481	30,609	8,479	54,840	0,911	8,374	10,220	7,632	101,400	22,678
C. parvum 6	0,080	14,850	19,935	10,082	57,071	1,231	9,297	10,264	6,340	44,400	19,413
C. parvum 7	0,026	6,913	28,385	8,993	50,438	1,323	5,708	7,934	9,280	44,450	20,489
C. parvum 8	0,030	5,875	26,204	8,479	61,593	1,144	4,809	7,753	7,439	56,950	20,489

Tablo 15. Kontrol grubundaki buzağların serum sitokin konsantrasyonları.

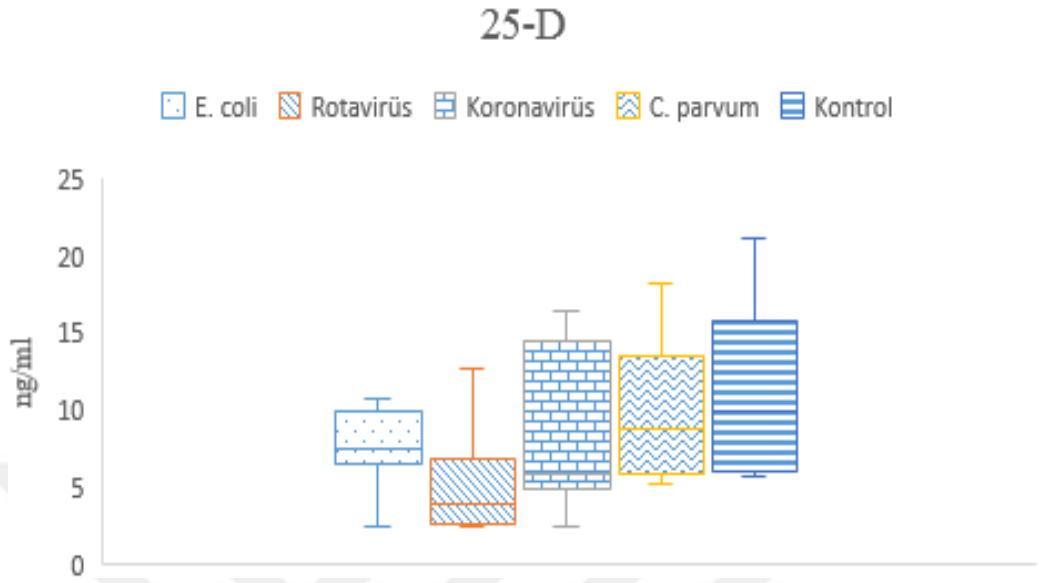
	SİTOKİNLER										
	TNF- α (ng/ml)	IFN- γ (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-5 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)	IL-13 (pg/ml)	IL-17 (pg/ml)
Kontrol 1	0,096	33,903	80,296	15,308	58,195	1,745	7,495	13,008	7,249	62,430	30,685
Kontrol 2	0,065	5,178	21,978	8,479	48,268	0,507	6,339	9,853	5,996	65,950	18,349
Kontrol 3	0,138	7,481	15,998	7,511	51,531	1,323	13,020	15,415	6,167	95,950	18,349
Kontrol 4	0,070	5,635	92,447	22,086	78,001	2,487	6,082	9,480	9,947	64,200	39,169
Kontrol 5	0,114	5,178	14,108	7,511	48,268	2,564	6,946	7,934	6,340	65,950	20,489
Kontrol 6	0,144	5,635	15,998	6,619	49,350	2,410	13,108	12,637	7,249	65,950	17,299
Kontrol 7	0,095	10,118	60,419	11,873	53,732	6,219	9,196	7,802	7,828	52,650	23,790
Kontrol 8	0,073	5,635	24,068	7,511	51,531	6,315	9,256	9,181	6,340	61,400	20,808

Tablo 16. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubundaki buzağların serum sitokin düzeylerinin ortancaları, değer aralığı ve gruplar arasındaki farklılığın istatistiksel önemi.

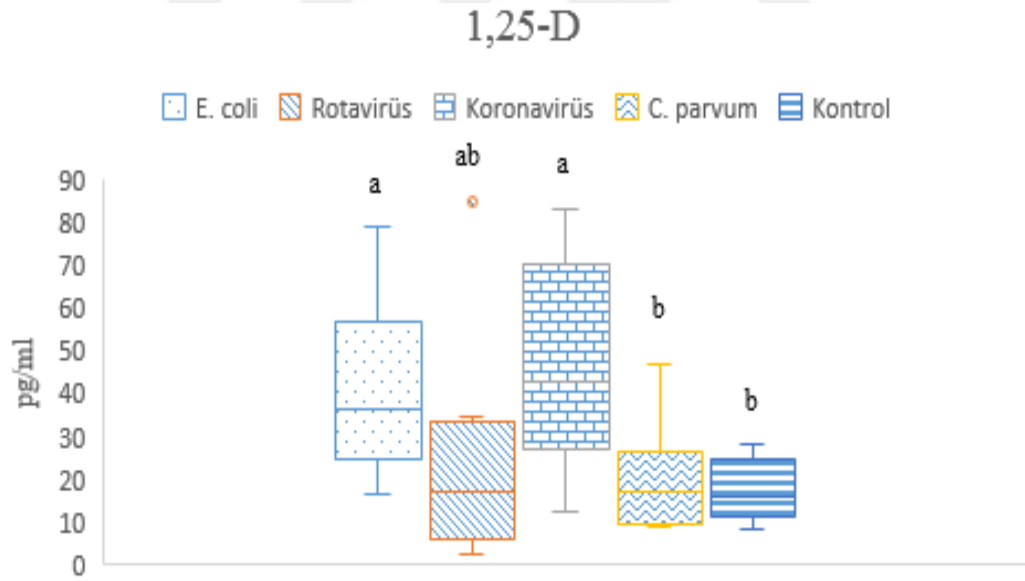
	GRUP					p
	E. coli	Rotavirüs	Koronavirüs	C. parvum	Kontrol	
TNF-α	0,212 (0,019-0,609) ^a	0,052 (0,018-0,095) ^b	0,050 (0,014-0,155) ^b	0,044 (0,026-0,134) ^b	0,096 (0,065-0,144) ^a	0,008
IFN-γ	32,56 (8,40-92,13) ^a	10,08 (4,96-26,93) ^b	6,06 (5,40-53,59) ^b	7,45 (5,18-14,85) ^b	5,64 (5,18-33,90) ^b	0,008
IL-1β	130,81 (21,98-260,75) ^a	24,13 (14,11-65,917) ^b	14,20 (10,50-132,35) ^b	28,39 (12,27-47,32) ^b	23,02 (14,11-92,45) ^b	0,020
IL-2	34,13 (6,20-82,23) ^a	9,83 (5,80-18,49) ^b	7,52 (6,62-21,15) ^b	8,59 (5,80-11,25) ^b	8,00 (6,62-22,09) ^b	0,039
IL-4	79,62 (53,73-162,67) ^a	49,89 (46,12-79,21) ^c	50,99 (49,35-81,63) ^{bc}	54,84 (50,44-62,74) ^b	51,53 (48,27-78,00) ^{bc}	0,005
IL-5	9,46 (0,61-18,87) ^a	1,83 (0,35-1,99) ^b	1,39 (0,55-8,73) ^{bc}	0,91 (0,51-1,32) ^c	2,45 (0,51-6,32) ^b	0,005
IL-6	11,31 (3,01-39,04) ^a	5,12 (3,24-18,86) ^c	5,65 (4,09-11,27) ^b	5,26 (3,76-9,30) ^c	8,35 (6,08-13,11) ^{ab}	0,033
IL-10	15,07 (5,82-46,37) ^a	7,61 (6,96-23,69) ^c	9,30 (3,37-18,68) ^{abc}	7,84 (5,61-10,26) ^{bc}	9,67 (7,80-15,42) ^{ab}	0,030
IL-12	12,63 (6,88-35,40) ^a	9,50 (7,63-14,53) ^{ab}	8,03 (7,25-10,88) ^b	7,34 (6,17-9,28) ^c	6,80 (6,00-9,95) ^c	<0,001
IL-13	94,55 (36,75-156,15)	70,70 (19,65-270,40)	61,65 (10,9-90,65)	44,45 (5,75-205,85)	65,08 (52,65-95,95)	0,139
IL-17	42,97 (21,58-94,45) ^a	20,50 (15,24-71,14) ^b	18,88 (17,30-55,99) ^b	21,58 (19,41-22,68) ^b	20,65 (17,30-39,17) ^b	0,013

a,b,c: Aynı satırdaki farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir (p<0,05). TNF- α : (ng/ml), diğer sitokinler: (pg/ml).

5.5. Şekiller

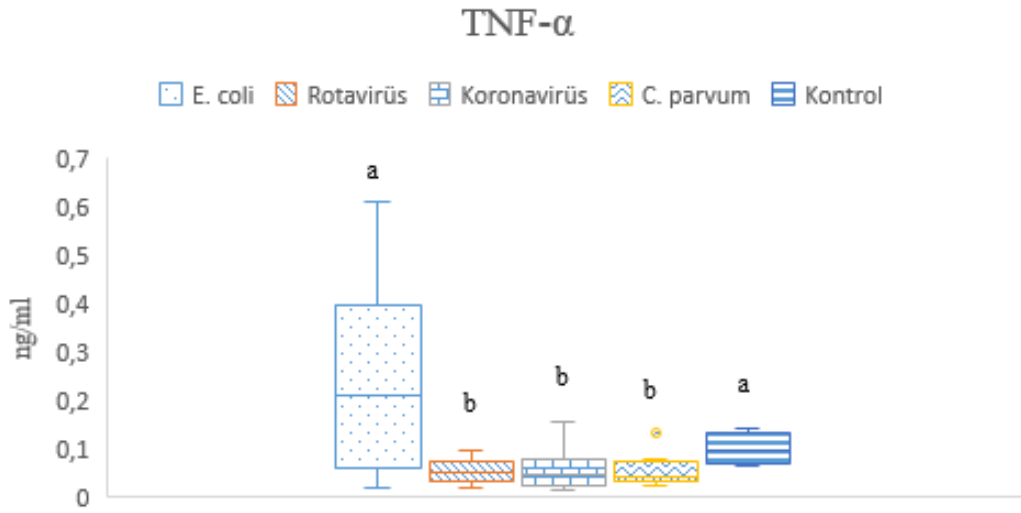


Şekil 5. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağlarının 25-D düzeyleri



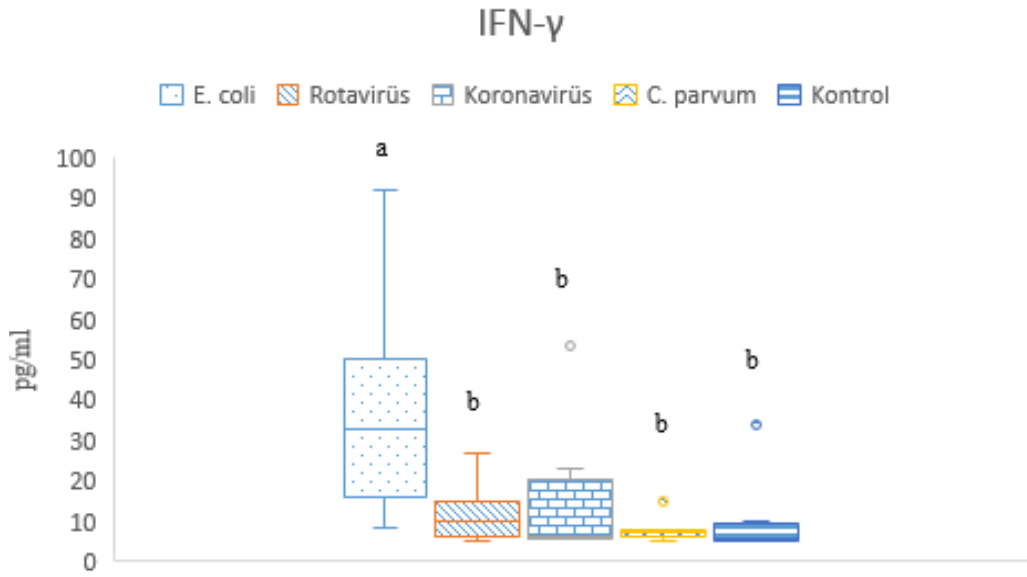
Şekil 6. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağlarının 1,25-D düzeyleri

a,b: Farklı harfler ile işaretlenen gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir ($p<0,05$).



Şekil 7. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağuların TNF- α düzeyleri

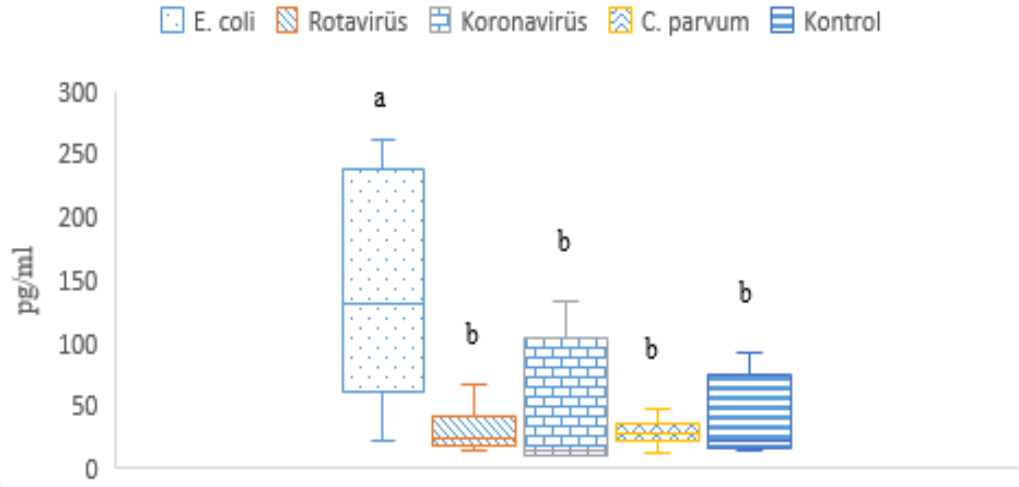
a,b: Farklı harfler ile işaretlenen gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir ($p < 0,05$).



Şekil 8. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağuların IFN- γ düzeyleri

a,b: Farklı harfler ile işaretlenen gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir ($p < 0,05$).

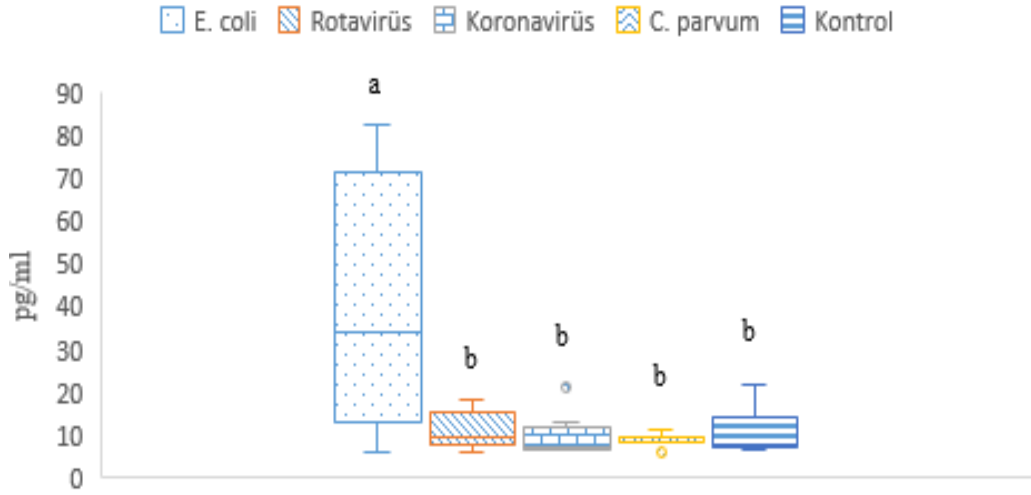
IL-1 β



Şekil 9. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağlarının IL-1 β düzeyleri

a,b: Farklı harfler ile işaretlenen gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir ($p < 0,05$).

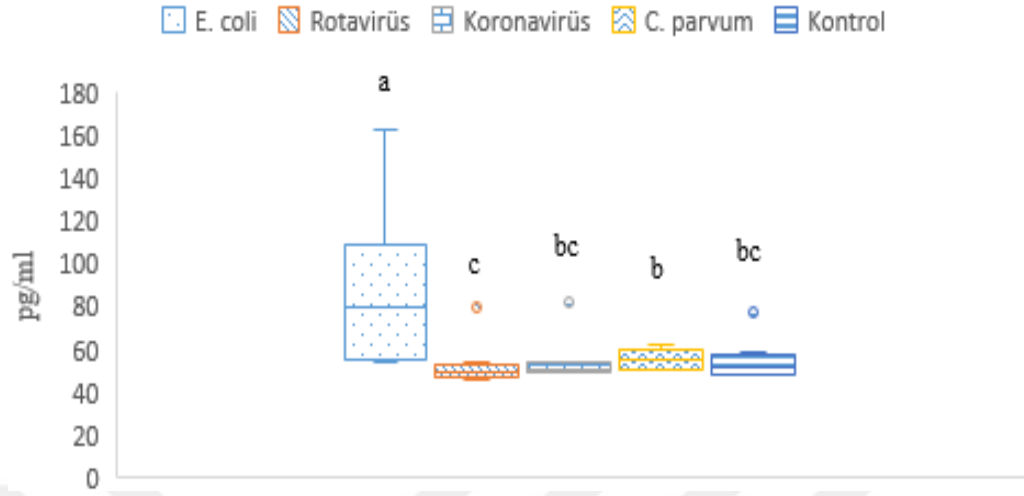
IL-2



Şekil 10. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağlarının IL-2 düzeyleri

a,b: Farklı harfler ile işaretlenen gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir ($p < 0,05$).

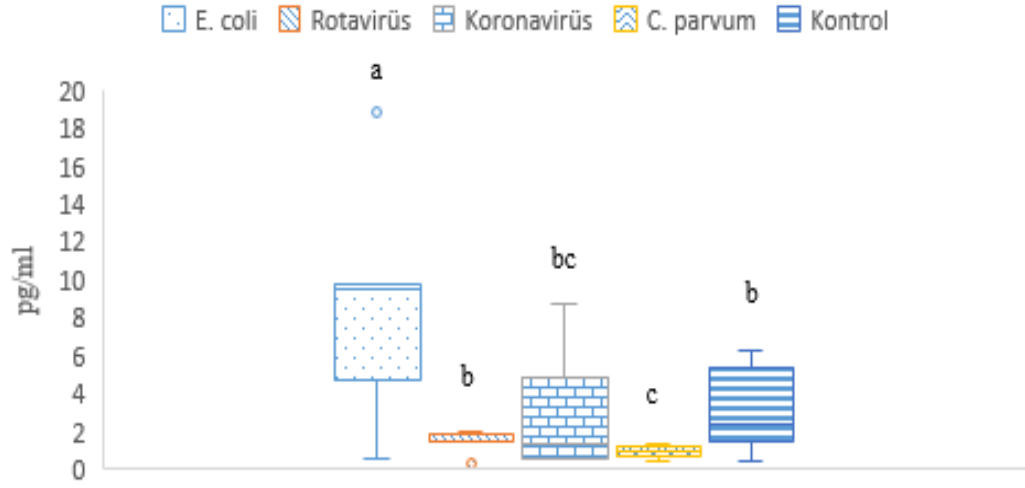
IL-4



Şekil 11. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağlarının IL-4 düzeyleri

a,b,c: Farklı harfler ile işaretlenen gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir ($p < 0,05$).

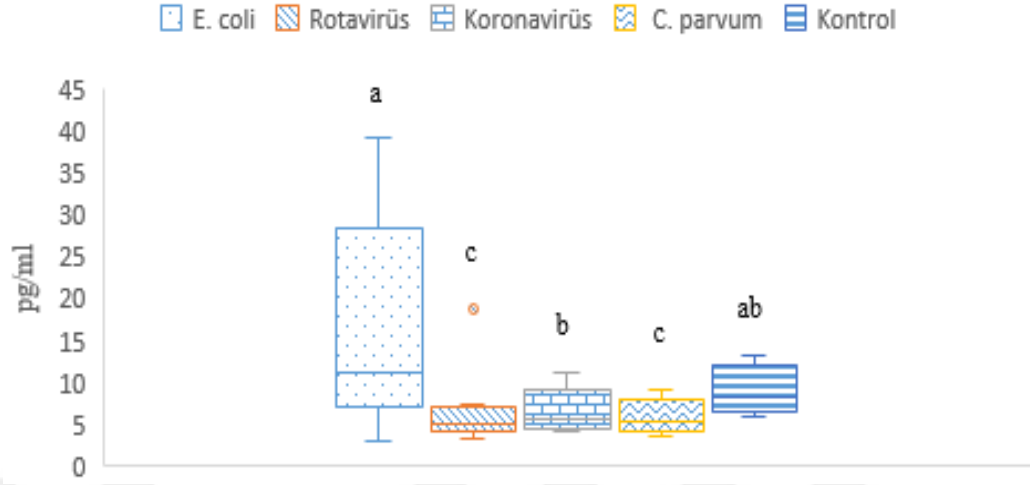
IL-5



Şekil 12. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağlarının IL-5 düzeyleri

a,b,c: Farklı harfler ile işaretlenen gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir ($p < 0,05$).

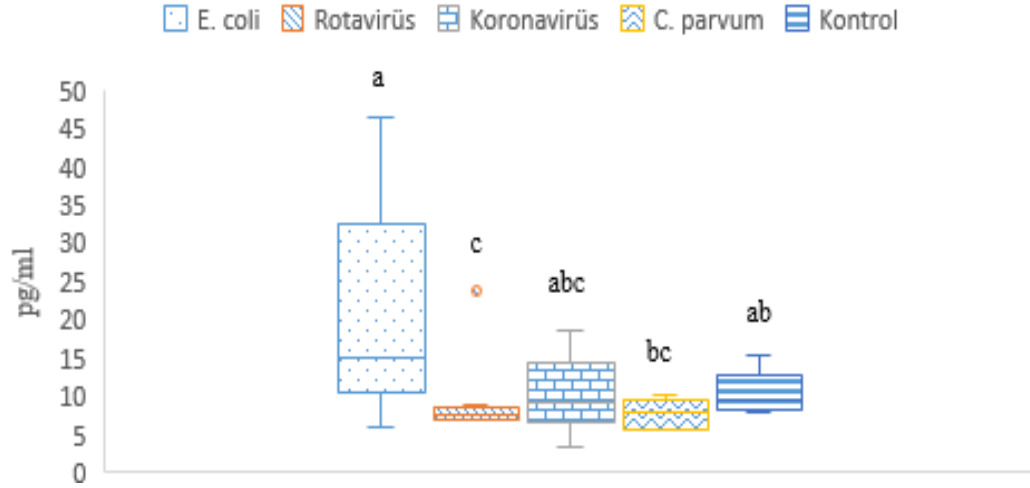
IL-6



Şekil 13. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağlarının IL-6 düzeyleri

a,b,c: Farklı harfler ile işaretlenen gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir ($p < 0,05$).

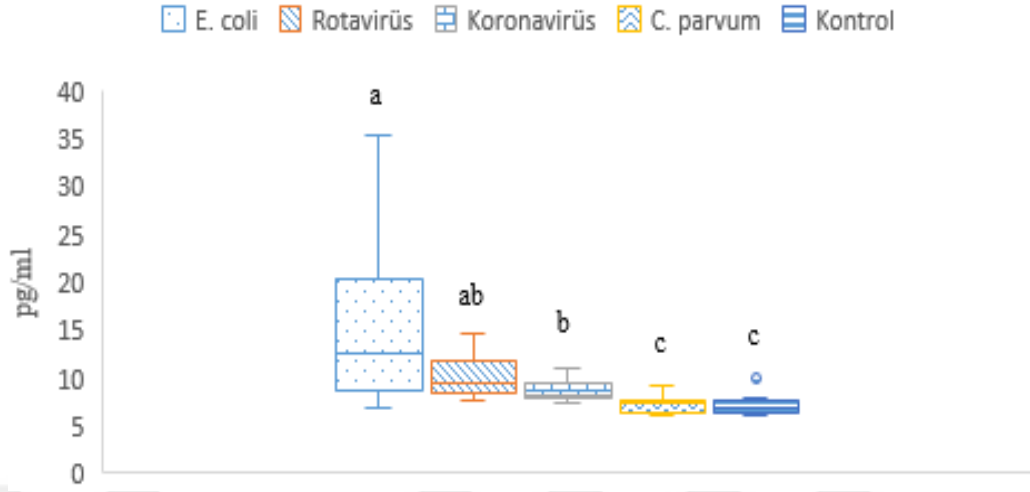
IL-10



Şekil 14. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağlarının IL-10 düzeyleri

a,b,c: Farklı harfler ile işaretlenen gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir ($p < 0,05$).

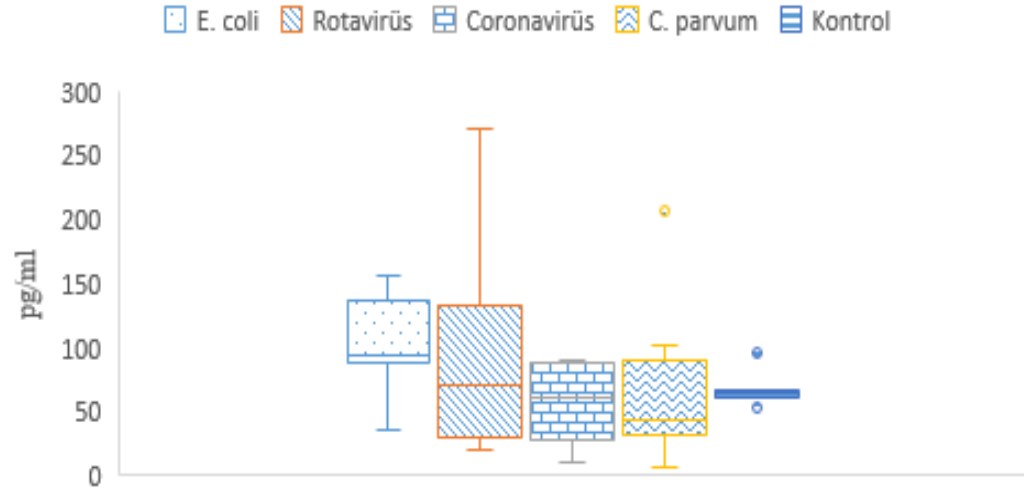
IL-12



Şekil 15. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağlarının IL-12 düzeyleri

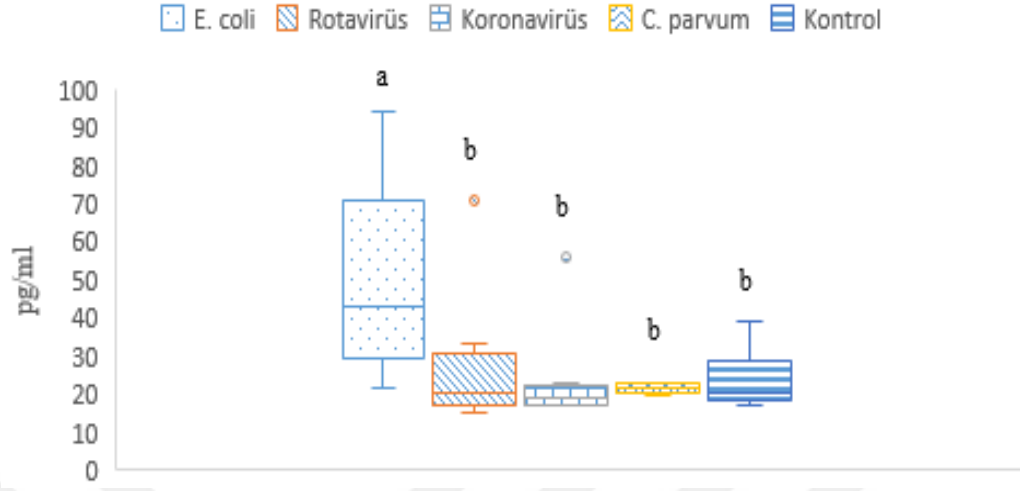
a,b,c: Farklı harfler ile işaretlenen gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir ($p < 0,05$).

IL-13



Şekil 16. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağlarının IL-13 düzeyleri

IL-17



Şekil 17. E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum ve Kontrol grubu buzağlarının IL-17 düzeyleri

a,b: Farklı harfler ile işaretlenen gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir ($p < 0,05$).

6. TARTIŞMA

Neonatal buzağı ishalleri, koruma ve tedavi uygulamalarındaki gelişmelere rağmen, yüksek morbidite ve mortalite oranları ile hayvancılık işletmelerinin çok önemli bir sorunu olmaya halen devam etmektedir. Neonatal dönemde buzağılarda hem enfeksiyöz hem de enfeksiyöz olmayan faktörler nedeniyle ishal oluşabilmekteyse de neonatal buzağı kayıplarının en önemli nedenleri bakteriyel, viral ve protozoal kaynaklı ishallerdir. Bu nedenle neonatal dönemdeki enfeksiyöz ishallerin seyri sırasında buzağılarda immün sistemin işleyişinin bilinmesi bu hastalıklara karşı tedavi yöntemleri ve korunma önlemlerinin geliştirilmesi açısından oldukça önem taşımaktadır.

Buzağılar doğdukları anda doğal immün sistemin bütün unsurlarına sahiptirler (44, 48). Ancak yeni doğan buzağılarda nötrofil, makrofaj, DC ve NK hücre fonksiyonları ve komplement aktivitesi yetişkinlere göre daha düşüktür (48). Diğer hayvanlardan farklı olarak, neonatal buzağılarda dolaşımdaki total lenfositlerin yaklaşık %60'ı $\gamma\delta$ T hücrelerinden oluşmaktadır. $\gamma\delta$ T hücrelerinin patojen tanıma ve antijen sunma yeteneklerinin olduğu ve yeni doğan buzağılarda henüz yeteri kadar fonksiyonel olmayan nötrofil, DC ve makrofajların bu yetersizliklerini dengeleyen kompenzatuvar özelliklerinin olabileceği bildirilmiştir (48, 189). Yeni doğan buzağılarda çok yeterli olmayan doğal immün sistem için kompenzatuvar bir diğer mekanizma ise kolostrumla anneye ait lökositlerin buzağıya nakledilmesidir. Kolostrum anneye ait yaklaşık %32'si canlı olan lökositleri içerir. Bu lökositlerin yaklaşık olarak %13'ü nötrofil, %16'sı lenfosit, %70'i monosit ve %0,3'ü eozinofildir (190). Kolostrumla alınan hücrelerin çoğu buzağının bağırsak epitelinden geçerek mezenterik lenf yumrularına yerleşir.

Anneye ait bu hücreler enfeksiyonlarda aktif olarak görev yapmak suretiyle antimikrobiyal etkinliklerini göstermelerinin yanı sıra yavruya ait nötrofil ve makrofajların fagositik kapasitelerini de yükseltirler (191, 192). Literatürde buzağı ishallerinde ortalama WBC değerinde sağlıklı buzağılara kıyasla artış olduğunu bildiren çalışmalar olduğu gibi, artış olmadığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (9, 193). Kim ve ark. (193) tarafından E. coli, Rotavirüs, Koronavirüs, C. parvum, Eimeria ve Giardia ile enfekte neonatal buzağılarda yapılan çalışmada, ortalama WBC sayısı sağlıklı buzağılarda $10,2 (x10^3/\mu L)$, ishalleri buzağılarda ise $10,9 (x10^3/\mu L)$ olarak bulunmuş ve ortalama WBC sayısının sağlıklı buzağılardan istatistiksel olarak farklı olmadığı bildirilmiştir. Özalp ve ark. (9) sağlıklı buzağılarda ortalama WBC değerini $10,01 (x10^3/\mu L)$, monoenfekte buzağılarda $17,28 (x10^3/\mu L)$ ve koenfekte ishalleri buzağılarda ise $21,48 (x10^3/\mu L)$ olarak bildirmiştir. Bu çalışmada ise bütün gruplardan elde edilen WBC sayısı, sığırlar için $4,9-12 (X10^3/\mu L)$ olarak bildirilen (135) referans değer aralığında bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analizde WBC sayısı bakımından gruplar arasında bir farklılık belirlenmemiştir.

Kazanılmış immün sistemin hücreleri olan $CD4^+$, $CD8^+$ T hücreleri ve hem doğal hem de kazanılmış immün sistem hücreleri gibi görev yapan $\gamma\delta$ T hücrelerinin buzağılarda doğum sırasındaki yüzdeleri yüksek olup, 6 aylık yaşa kadar benzer yüzdelerin devam ettiği bildirilmiştir (56). Antijenik uyarımlara karşı neonatal buzağıların T hücre yanıtının yetişkinlerle benzer olduğu ancak B hücre yanıtının yetişkinler kadar iyi olmadığı ortaya konulmuştur (57-60).

Plasenta yapısından dolayı agammaglobülinemik doğan buzağılar kolostrum aldıkları zaman içeriğindeki yüksek orandaki immünoglobülinler yavruya geçerek güçlü bir pasif korunma sağlanmış olur. Doğumdan sonra kolostrumla alınan maternal antikorların buzağının B hücre yanıtını ve dolayısı ile antijen spesifik immünglobülin sentezini aksattığı ancak T hücre yanıtının bu durumdan etkilenmediği belirtilmiştir (57-60). Bu çalışmada, anamnezden tüm hayvanların doğumdan sonra yeterli kolostrum almış oldukları belirlenmiş, ayrıca refraktometre ile pasif bağışıklık yeterliliği saptanmış ve böylece immün cevapta oluşabilecek bireysel farklılıklar en az seviyeye indirilmiştir.

Plazma proteinlerinden biri olan fibrinojen, özellikle ruminantlarda birçok inflamatuvar hastalıkta artış gösterir ve önemli inflamasyon parametrelerinden birisidir. İnflamatuvar hastalıklar dışında ayrıca diğer plazma proteinleri gibi dehidrasyona bağlı olarak da artış gösterebilir (135). Bu çalışmada, rakamsal olarak bütün hasta gruplarının fibrinojen konsantrasyonu kontrol grubundan yüksek çıkmış olsa da istatistiksel olarak C. parvum, Koronavirüs ve Rotavirüs gruplarında kontrol grubundan daha yüksek bulunmuştur. Ancak bu gruplarda fibrinojen artışı ile inflamatuvar sitokinler arasında pozitif bir bağlantı tespit edilmemiştir.

Son yıllarda, D vitamininin kalsiyum homeostazındaki klasik rolleri dışında immün sistemde de önemli fonksiyonlara sahip olduğu ile ilgili çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Bu çalışmaların çoğu 2 temel veriye dayanmaktadır. Bunlardan birincisi immün sistemdeki hemen hemen tüm hücrelerin VDR'ye sahip olduğunun keşfedilmesi; ikincisi ise birçok immün hücrede (monositler, makrofajlar, DC ve T hücreleri) CYP27B1 ekspresyonu olduğunun ve dolayısıyla

bu hücreler tarafından ekstrarenal olarak 1,25-D sentezlenebildiğinin belirlenmesidir. İmmün hücreler tarafından sentezlenen 1,25-D'nin hem sentezlendiği (otokrin etki) hem de diğer immün hücrelerdeki (parakrin ve endokrin etki) VDR'lere bağlanarak immün sistemde düzenleyici fonksiyonlarının olabileceği gündeme gelmiştir (69, 98). İzleyen dönemdeki çok sayıda in vitro ve daha az sayıda in vivo çalışmalarda ekstrarenal 1,25-D'nin hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık üzerinde fazla sayıda ve farklı rollerinin olduğu gösterilmiştir. Ekstrarenal 1,25-D'nin doğal immün sistemdeki fonksiyonları vücuda giren patojenlerle savaşta oldukça değerlidir. Antijenik uyarımı izleyerek doğal immün sistem hücreleri olan makrofajlar ve DC tarafından sentezlenen 1,25-D, katelisidin ve beta defensin gibi antimikrobiyal proteinlerin ekspresyonunu artırır (96). Antimikrobiyal proteinler bakteri ve virüslerle mücadelede oldukça etkili moleküllerdir (97, 98). Buna ek olarak sentezlenen 1,25-D hepsidin sentezini baskılamak suretiyle hücre içindeki demir konsantrasyonunu düşürür (63). Böylece hücre içi bakterilerin üremeleri için hayati önemde olan demirden yararlanmasının önüne geçilir. Ayrıca ekstrarenal 1,25-D, tüberküloz basili ve virüsler gibi hücre içi patojenlerle savaşta önemli bir role sahip olan otofajiyi güçlü bir şekilde artırır (100). Uyarılmış olan antijen sunan hücreler (makrofajlar ve DC) tarafından sentezlenen 1,25-D, kazanılmış immün sistemde T hücre cevaplarının şekillenmesinde çok önemli fonksiyonlara sahiptir. Ekstrarenal 1,25-D, inflamatuvar Th1 ve Th17 hücrelerini baskımlarken, immünotolerogen olan Treg hücrelerini indükler (94, 100).

Vücuda giren patojenlere karşı kısa sürede aktive olan immün sistemin hem doğal ve hem de kazanılmış bağışıklık kollarına ait hücrelerin arasındaki koordinasyonun sağlanmasında sitokinler oldukça önemli moleküllerdir (2, 30). Ekstrarenal 1,25-D'nin immün sistem üzerindeki etkinliğinin önemli mekanizmalarından birisi immün hücreler tarafından sentezlenen sitokinlerin düzenlenmesidir. Ekstrarenal 1,25-D'nin inflamatuvar sitokinlerin sentezini baskımlarken, anti-inflamatuvar sitokinlerin sentezini arttırdığı yönünde genel bir kabul bulunmaktadır (83, 94, 101).

Bu çalışmada, neonatal buzağı ishallerinde şekillenen immün cevabın değerlendirilmesinde serum sitokin düzeyleri kullanılmıştır. Serum sitokin düzeyleri immün sistemin patojenlere karşı verdiği cevabın belirlenmesinde sık olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışmada neonatal dönem olarak bilinen yaşamın ilk 28 günü içerisindeki birbirlerine yakın yaştaki buzağılar kullanılmıştır. Bu nedenle çalışmada kullanılan tüm buzağının immün sistemlerinin gelişimi ve antijene karşı immün cevap yeterlilik düzeyi konusundaki benzerlikleri de yüksek oranda sağlanmıştır. Bu deney seti ile buzağılarda bakteriyel, viral ve protozoal patojenlere karşı şekillenen immün cevaptaki farklılıklar dolaşımdaki sitokin düzeylerine bağlı olarak değerlendirilmiş ve bu cevaplarla serum D vitamini metabolitleri arasında nasıl bir ilişki olduğu karşılaştırmalı olarak ortaya konulmuştur.

Organizmada D vitamini yeterliliğinin değerlendirilmesinde genellikle dolaşımdaki 25-D düzeyi ölçümleri kullanılmaktadır (132). Genel olarak yetişkin sığırlara kıyasla yenidoğan buzağılarda serum 25-D düzeyinin daha düşük olduğu bildirilmektedir (64).

İnekler ile buzağlarının D vitamini düzeyleri arasında korelasyon olduğunu bildiren çalışmaların (194, 195) yanı sıra önemli bir korelasyon olmadığını bildiren çalışmalar (196, 197) da bulunmaktadır. Nelson ve ark. (64) tarafından yapılan çalışmada yenidoğan buzağların 25-D düzeyinin ortalama 15 ng/ml olduğu ve bu buzağların %25'inde ise değerlerin 10 ng/ml'nin altında olduğu bildirilmektedir. Nelson ve ark. (196) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise buzağların ortalama 25-D düzeylerinin 11 ng/ml olduğu belirlenmiş, bununla birlikte hayvanların %80'den fazlasında değerlerin 20 ng/ml'nin altında olduğu bildirilmiştir. Casas ve ark. (198) 10-12 aylık sığırlarda 25-D düzeylerini ortalama 15-16 ng/ml olarak belirlemiştir. Callaby ve ark. (199) 3-7 günlük buzağlardaki 25-D düzeyi ortalamasını 10,42 ng/ml olarak bildirmiştir. Flores-Villalva ve ark. (200) tarafından yapılan çalışmada yenidoğan buzağlarda ortalama 25-D düzeyinin 7,64 ng/ml olduğu ve bu buzağlara oral veya enjektabl yolla D vitamini takviyesi yapıldığında dahi 25-D konsantrasyonlarının hayvanlar en az 3 aylık oluncaya kadar 30 ng/ml düzeyine ulaşamadığı bildirilmiştir. Buna karşın buzağlara parenteral 25-D süplementasyonun serum 25-D konsantrasyonunu önemli ölçüde arttırdığını bildiren çalışmalar (196, 213) da bulunmaktadır. Bu çalışmada kontrol grubundaki buzağlarda tespit edilen 9,9 ng/ml'lik serum 25-D medyan düzeyi, araştırmacılar (64, 196, 198-200) tarafından bildirilenlerle uyum içerisindedir.

Birçok epidemiyolojik çalışmada yetersiz serum 25-D düzeyleri ile özellikle çocuklardaki solunum sistemi enfeksiyonları arasında bir ilişki olduğu ileri sürülmüştür (201, 202).

Yetersiz 25-D düzeyine sahip bireylerde solunum sistemi hastalıklarına yakalanma riskinin ve hastalığın şiddetinin arttığı bildirilmiştir (203, 204). Benzer durum diğer bazı enfeksiyonlar için de ileri sürülmüştür (3, 68). D vitamini süplemantasyonu yapılarak 25-D düzeyinin arttırıldığı bazı çalışmalarda solunum sistemi enfeksiyonlarının insidans ve şiddetinde azalma olduğu bildirilirken, bazılarında bu süplemantasyonun önemli bir etkisi olmadığı ileri sürülmüştür (205-208). Neonatal diyareli buzağılarda yapılan bir çalışmada, rotavirüs, koronavirüs ve C. parvum ile enfekte buzağıkların serum 25-D düzeylerinin sağlıklı buzağılardan daha düşük olduğu, ancak E. coli ile enfekte buzağılar ile sağlıklı buzağılar arasında 25-D düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadığı vurgulanmıştır (9). Köpeklerde yapılan bir çalışmada ligament rupturu operasyonundan önce ve sonra serum 25-D düzeyleri ölçülmüştür. Operasyondan sonraki gün operasyon öncesine göre serum 25-D düzeyinin düştüğü belirlenmiştir. Ayrıca operasyon grubunda operasyondan sonraki gün akut faz proteinlerinden biri olan CRP düzeyinde önemli artış olduğu gözlenmiştir. Anılan çalışmada 1,25-D düzeyleri ölçülmediğinden 25-D'deki bu düşüşün 1,25-D sentezinin artmasına bağlı olarak gelişip gelişmediği kesin olarak belirlenememiştir (210). Mycobacterium avium paratuberculosis ile enfekte sığırların serum 25-D düzeylerinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu bildirilmiştir (211). Mycobacterium avium paratuberculosis ile doğal yolla enfekte olmuş sığırlarda yapılan başka bir çalışmada klinik hastalık belirtisi gösteren grubun serum 25-D düzeylerinin subklinik enfekte ve kontrol gruplarına göre daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Anılan çalışmada serum 1,25-D düzeyleri belirlenmemiş ancak ileosekal dokularda CYP27B1 gen aktivitesinin klinik enfekte grupta diğer gruplara göre daha fazla olduğu bildirilmiştir (212). Bu çalışmada, buzağların serum 25-D düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamıştır. Ancak istatistiksel olarak önemli olmasa da kontrol grubuna göre hasta gruplarının serum 25-D düzeylerinde azalmalar olduğu görülmüştür. Bu azalmaların dolaşımdaki 25-D'nin immün hücreler tarafından 1,25-D sentezinde kullanılmasından kaynaklanmış olabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır (127).

Neonatal sağlıklı buzağlarda dolaşımdaki 1,25-D düzeyinin belirlendiği bir çalışmada, 0.günde 1,25-D düzeyi ortalama 41,2 pg/ml olarak bildirilmiştir (194). Nonnecke ve ark. (213) tarafından yeni doğan buzağlarda radyoimmün test (RIA) yöntemi kullanılarak yapılan bir araştırmada ortalama 1,25-D düzeyinin 0. günde 130 pg/ml'nin üzerinde olduğunu ve buzağının yaşı ile doğru orantılı olarak azalıp 12-16. günlerde 50 pg/ml'nin altına düştüğü ve sonraki günlerde tekrar bir miktar artış gösterdiği belirlenmiştir. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile yapılan bir çalışmada ise yağ içerikleri farklı kolostrumla beslenen sağlıklı buzağlardaki 1,25-D düzeyinin 0. günde 40 pg/ml civarında olduğu, 1.ve 2. günlerde 90 pg/ml düzeylerine yükseldikten sonra normal kolostrum alan grupta 70 pg/ml, yağı alınmış kolostrum alan grupta ise tekrar 40 pg/ml düzeylerine indiği bildirilmiştir (214). Bu çalışmada ise kontrol grubunu oluşturan sağlıklı buzağlarda dolaşımdaki 1,25-D düzeyinin medyan değeri 15,93 pg/ml olarak bulunmuştur. Bu değer, diğer çalışmalarda (194, 213, 214) bildirilenlerden daha düşük düzeydedir. Bu farklılık çalışmalarda farklı ölçüm metodlarının kullanılması ile ilişkili olabilir.

Uzun yıllar boyunca immün hücreler tarafından sentezlenen 1,25-D'nin çok düşük konsantrasyonlarda olduğu, sadece otokrin ve parakrin etkilere sahip olduğu ve dolaşıma geçmediği ileri sürülmüştür. Ancak bazı inflamatuvar ve enfeksiyon hastalıklarda dolaşımda önemli miktarda ekstrarenal 1,25-D varlığının olduğunu bildiren çalışmalar yapılmıştır (125-127). Bu çalışmada benzer şekilde, serum 1,25-D düzeyleri *E. coli* ve Koronavirüs gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç diğer araştırmacıların bulguları ile benzerlik göstermektedir. Hem bu çalışmada hem de diğerlerinde kullanılan hayvanlarda renal 1,25-D sentezi devam ettiği için dolaşımdaki 1,25-D düzeyindeki artışın kesin olarak ekstrarenal kaynaklı olduğu iddia edilemeyecektir. Ancak koriza gangrenoza bovumlu sığırlarda belirlenen serum 1,25-D artışı PTH ve kalsitonin değerleri ile birlikte değerlendirildiğinde bu artışın kaynağının Ca metabolizması ile ilişkili olmadığı ve dolayısıyla ekstrarenal bir sentezin varlığını gösterdiği bildirilmiştir (127). Ayrıca nefrektomili ratlarda immün stimülasyon sonucu dolaşımdaki 1,25-D düzeyinin arttığı da kesin olarak ortaya konulmuştur (79). Tüm çalışmaların sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, *E. coli* ve Koronavirüs gruplarında artmış olan serum 1,25-D düzeylerinin ekstrarenal özellikle de immün hücre kaynaklı olma olasılığı oldukça kuvvetlidir. *E. coli* grubunda 1,25-D artışı yanında IFN- γ düzeyinde de benzer şekilde artış belirlenmiştir. IFN- γ 'nın makrofajlarda CYP27B1 ekspirasyonunu ve dolayısıyla 1,25-D sentezini uyaran en güçlü stimülatör olduğu göz önüne alındığında bu gruptaki artışın IFN- γ 'nın etkisi ile gerçekleşmiş olması da kuvvetle muhtemeldir (115).

Bunun dışında Gram (-) bakteri duvarı ürünü olan LPS'nin de immün hücrelerden 1,25-D sentezini uyardığı bilinmektedir. Özellikle E. coli enfeksiyonunda artan LPS düzeyleri de bu gruptaki 1,25-D artışından sorumlu olabilir.

Bu çalışmada, serum 25-D ve 1,25-D düzeyleri arasında korelasyon bulunmamıştır. Nonnecke ve ark. (213) da benzer şekilde buzağılarda serum 25-D ve 1,25-D düzeyleri arasında korelasyon bulunmadığını bildirilmektedir.

Kim ve ark. (215) 40 günlük sağlıklı buzağılarda ortalama serum TNF- α düzeyini 0,36 ng/ml ve IFN- γ düzeyini 13,3 pg/ml olarak bildirmektedir. Gelsinger ve ark. (216) tarafından yapılan bir çalışmada ise sağlıklı buzağılarda IFN- γ 0.günde 0,5 pg/ml ve 24-48. saatlerde ise 9,4 pg/ml olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada IL-1 β konsantrasyonu 0. günde tespit edilemeyecek düzeyde ve 24-48. saatlerde 382 pg/ml olarak bildirilmiştir. Asgarpour ve ark. (217) tarafından yapılan bir çalışmada 2-4 aylık sağlıklı buzağılarda IL-1 β konsantrasyonu yaklaşık 10-15 pg/ml olarak bildirilmiştir. Sun ve ark. (218) yeni doğan buzağılarda serum IFN- γ konsantrasyonunu 30,97 pg/ml olarak bildirmiştir. Brodzki ve ark. (219) yetişkin sağlıklı sığırlarda TNF- α düzeyini 0,2-0,3 ng/ml aralığında bildirmiştir. Bordignon ve ark. (220) sağlıklı buzağılarda TNF- α ve IFN- γ düzeylerini yaklaşık olarak sırasıyla 0,12 ng/ml ve 70 pg/ml olarak bildirmiştir. Bu çalışmada sağlıklı buzağılardan oluşturulan kontrol grubu buzağılarında ise TNF- α ve IFN- γ ve IL-1 β medyan düzeyleri sırası ile 0,096 ng/ml, 5,64 pg/ml ve 23,02 pg/ml olarak bulunmuştur.

Sağlıklı yetişkin sığırlarda ortalama serum IL-12 konsantrasyonları 7-14 ng/ml aralığında bildirilmektedir (221, 222). Bu çalışmada kontrol grubunun IL-12 medyan değeri 6,8 pg/ml olarak bulunmuştur. Asgarpour (217) sağlıklı buzağılarda ortalama serum IL-6 ve IL-10 düzeylerini sırası ile 2-2,5 ve 60-80 pg/ml aralığında bildirmektedir. Sun ve ark. (218) yenidoğan sağlıklı buzağların serum IL-4, IL-6 ve IL-10 konsantrasyonlarını sırasıyla 39,32 pg/ml, 183,11 pg/ml ve 32,29 pg/ml olarak bildirmektedir. Barigye ve ark. (223) sağlıklı yetişkin sığırlarda IL-6 ve IL-10 düzeylerinin sırasıyla yaklaşık 20-25 ve 15-20 pg/ml aralığında olduğunu bildirmektedir. Bu çalışmada IL-4, IL-6 ve IL-10 medyan değerleri sırası ile 51,53; 8,35 ve 9,67 pg/ml olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan kontrol grubu buzağların serum inflamatuvar sitokin (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-12) konsantrasyonlarının literatürde sağlıklı buzağlar için bildirilen serum sitokin konsantrasyonları ile benzer veya bir miktar daha düşük düzeyde olduğu görülmektedir. Yine anti-inflamatuvar sitokin (IL-4, IL-6, IL10) düzeyleri de literatürde belirtilen düzeyler ile benzerlik göstermektedir. Bu sonuçlar kontrol grubu buzağların klinik olarak sağlıklı olmalarının yanında inflamatuvar bir problemlerinin olmadığını da bir göstergesi olarak değerlendirilebilir.

Deneyssel olarak E. coli ile enfekte edilen buzağılarda serum TNF- α düzeylerinin kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak olmasa da rakamsal olarak arttığı, IL-6 ve IFN- γ düzeylerinin ise kontrol gruplarına oranla istatistiksel olarak yükseldiği bildirilmiştir (224). Pourjafar ve ark. (6) E. coli, rotavirüs, koronavirüs ve C. parvum ishallerinde TNF- α ve IFN- γ seviyelerinin kontrol grubundan yüksek olduğunu bildirmiştir. Kırbaş ve ark. (4) neonatal sepsisli buzağılarda TNF- α ve IL-6 düzeylerinde kontrol grubuna göre artış olduğunu bildirmiştir.

Patojenik etken türünün belirlenmediği bir çalışmada neonatal ishalli buzağların plazmalarında IL-1 β , IL-6 ve TNF- α düzeylerinin arttığı ancak IL-10 düzeylerinde kontrol grubuna göre önemli bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir (5). Fischer ve ark. (4) tarafından neonatal diyareli buzağlarda yapılan bir çalışmada ise ishalin başlangıcında serum IL-6 düzeyi yüksek olan buzağların prognozunun daha kötü olduğu bildirilmiştir. Beheshtipour ve ark. (5) neonatal ishalli buzağların plazma örneklerinde yaptıkları ve etiyolojik etkenin belirtilmediği bir çalışmada, ishalli buzağlarda IL-1 β düzeylerini ortalama 506,92 pg/ml, kontrol grubu buzağlarda ise 81,78 pg/ml olarak; IL-6 düzeylerini ishalli buzağlarda ortalama 23,87 pg/ml, kontrol grubunda ise 14,53 pg/ml olarak; TNF- α düzeylerini ishalli grupta 0,17 ng/ml, kontrol grubunda ise 0,023 ng/ml olarak; IL-10 seviyesini ishal grubunda 26,55 pg/ml, kontrol grubunda 15,79 pg/ml olarak bildirmiştir.

Bu çalışmada, E coli grubunda, IL-1 β , IL-2, IL-12, IL-17 ve IFN- γ gibi inflamatuvar sitokinlerin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artması bu grupta şiddetli bir inflamatuvar sürecin varlığını işaret etmektedir. İnflamatuvar sitokinlerdeki bu artış diğer çalışmaların (6, 7) sonuçlarıyla uyumludur. Bunun yanında T hücrelerince sentezlenen IL-4 ve IL-5 gibi güçlü anti-inflamatuvar etkiye sahip sitokinlerin de önemli düzeyde artmış olması, kolibasillozun patogenezi için önemli bulunmuştur. Kazanılmış bağışıklığın Th2 yönünde de geliştiği görülmektedir. Th2 yönündeki kazanılmış bağışıklığın gelişiminde bu grupta önemli oranda artmış olan serum 1,25-D düzeyinin etkilerinin olması olasıdır.

Hem makrofajlar ve DC hem de aktive olmuş T hücreleri tarafından sentezlenen 1,25-D'nin Th2 etkiliğini artırmak suretiyle inflamasyonu kontrol altında tutarak immünmodülatör etkinlik gösterdiği invitro ve invivo çalışmalarda vurgulanmıştır (68, 83). Bunlara ek olarak, buzağılarda E. coli ishallerinin diğer enfeksiyöz ishallere göre genelde daha erken yaşta şekillendiği göz önüne alındığında, E. coli grubundaki buzağılarda erken neonatal dönemde bile antijenik uyarıya yanıt olarak yeterli sitokin üretebildiği görülmektedir. Bu çalışmada, IL-13 dışındaki diğer tüm sitokinler için E. coli grubunun en yüksek ortalama konsantrasyona sahip olduğu ve diğer gruplardan en az birinden istatistiksel olarak önemli düzeyde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Buna sebep olarak hastalık etkenlerinin farklı antijenik özelliklere ve patogeneze sahip olmaları gösterilebilir. Gr (-) bakteri olan E. coli'nin membranında bulunan LPS immün hücrelerden sitokin sentezinin iyi bir uyarandır (91, 142, 145).

Bu çalışmada, Rotavirüs grubunda kontrol grubuna göre inflamatuvar sitokinlerden serum IL-12 düzeyinde artış olmasına karşın TNF- α , IL-6 düzeylerinde azalma ve diğerlerinde ise farklılık olmaması bu hastalıkta şiddetli bir inflamatuvar seyrin olmadığını göstermektedir. E. coli grubunun aksine anti-inflamatuvar sitokinlerden IL-10 dışındakilerde farklılık görülmemiş, IL-10 düzeyinde ise azalma belirlenmiştir. Rotavirüs grubunda inflamatuvar seyrin olmaması yanında, istatistiksel olarak önemli olmasa da serum 25-D düzeyinde azalma ve 1,25-D düzeyinde artış olması lokal 1,25-D sentezinin varlığına işaret edebilir.

Bu çalışmada, Koronavirüs grubunda inflamatuvar sitokinlerden IL-12 artışına karşın TNF- α düzeyinde azalma olup, diğerlerinde farklılık olmamıştır. Antiinflamatuvar sitokinlerde de kontrol grubuna göre önemli bir farklılığın belirlenmemiş olması bu hastalarda belirgin bir inflamatuvar sürecin olmadığına işaret etmektedir. Bu grupta serum 1,25-D düzeyinin kontrol grubuna göre önemli düzeyde artmış olması immün hücreler tarafından ekstrarenal 1,25-D sentezinin varlığını işaret edebilir.

Aich ve ark. (226) buzağı intestinal dokuları ile yaptıkları in vitro çalışmada hem rotavirüs hem de koronavirüs ile oluşturulan enfeksiyon modellerinde rotavirüs enfeksiyonunda IL-6 ile ilişkili genlerin aktivasyonunda koronavirüs enfeksiyonuna göre artış olduğunu, ancak ilginç bir şekilde IFN- γ ile ilişkili genlerde her iki virüs grubunda da azalma görüldüğünü bildirmiştir. Benzer şekilde bu çalışmada rotavirüs ve koronavirüs gruplarının IFN- γ düzeylerinin kontrol grubundan istatistiksel olarak farksız olduğu görülmektedir. Bu sonuç rotavirüs ve koronavirüs enfeksiyonlarında IFN- γ sentezinin dolayısı ile Th1 immün yanıtının engellendiğinin bir göstergesi olarak değerlendirilebilir.

Bu çalışmada, C. parvum grubunda koronavirüs grubuyla benzer şekilde inflamatuvar sitokinlerden TNF- α düzeyinde azalma belirlenmiştir. Diğerlerinde ise bir farklılık görülmemiştir. Bunu yanında anti-inflamatuvar sitokinlerden IL-4 ve IL-5 düzeylerinde kontrollere göre belirgin azalmanın olması bu hastalarda immün sistemin baskılanmış olduğunun bir göstergesi olabilir.

Drinkall ve ark. (185) buzağı intestinal dokularında deneysel olarak C. parvum enfeksiyonu oluşturarak yaptıkları in vitro çalışmada C. parvum ile enfekte edilen dokularda IL-17 sentezinde artış olduğunu ancak IL-1 β sentezinde

değişim olmadığını bildirmiştir. Li ve ark. (181) tarafından buzağılarda deneysel olarak oluşturulan *C. parvum* enfeksiyon modelinde enfeksiyondan sonraki 3. günde serum IFN- γ , IL-2, IL-4 ve IL-12 düzeylerinde kontrol grubuna göre düşüş olduğunu; 6. günde ise IFN- γ , IL-4 ve IL-12 düzeylerinde düşüş olduğunu bildirilmiştir. 9. günde ise IFN- γ ve IL-4 seviyelerinde azalma ve IL-12 düzeyinde artış olduğunu bildirilmiştir. Bu çalışmada *C. parvum* grubunda serum IL-17, IL-1 β , IFN- γ , IL-4, IL-2 ve IL-12 düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel bir değişim gözlenmemiştir. Çalışmalar arasındaki farklılık ölçümde kullanılan materyalin farklılığından ileri gelmiş olabilir. Deneysel olarak *C. parvum* ile enfekte edilen buzağıkların periferik kan lenfosit hücreleri ile in vitro yapılan bir çalışmada, lenfositlerin IFN- γ ve IL-12 mRNA ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir (227). Diğer bir deneysel çalışmada ise buzağılarda *C. parvum* enfeksiyonunda intestinal epitelyal hücrelerde IFN- γ ve IL-12 sentezinde artış olduğu, IL-2, IL-4 ve IL-10 sentezinde önemli bir değişim olmadığı bildirilmiştir (8). Araştırmacılar (8, 227) dokularda lokal üretilen sitokin düzeylerini belirledikleri için bu çalışmalarda dolaşıma geçen sitokin miktarının ne kadar olduğu bilinmemektedir. Dolaşımdaki sitokin miktarlarının ölçüldüğü bu çalışma ile diğer çalışmalar arasında farklılıklar olmasının muhtemel sebebi yöntem farklılıkları olarak düşünülmüştür.

İshalli buzağılarda sitokin düzeylerinin belirlendiği araştırmaların sonuçları ile bu çalışmadaki hasta gruplarından elde edilen sitokin düzeyleri değerlendirildiğinde, bazı gruplarda benzerlik varken, bazı gruplarda farklılık olduğu görülmektedir. Bu farklılıklar klinik çalışmalarda kan alma zamanlarında bireylerdeki hastalığın şiddetinin farklılık göstermesi ile açıklanabilir.

Yarı ömürleri çok kısa olan sitokinlerin kandaki düzeylerinde hastalığın seyri sırasında dalgalanmalar olması da olasıdır. Bu çalışmada hem inflamatuvar hem de anti-inflamatuvar sitokinlerden mümkün olduğunca en fazla sayıda belirlenerek analizleri yapılmıştır. Böylece uyarım şekilleri, uyarım şiddetleri ve yarı ömürleri çok sayıdaki farklı sitokin dolaşımdaki düzeylerinin aynı bireyde eş zamanlı olarak birlikte ölçülmesi ile inflamatuvar ve antiinflamatuvar immün cevap hakkında daha geniş bir açıdan değerlendirme yapılabilmesi mümkün olmuştur.

Bu çalışma klinik bir çalışma olup, doğal hastalar üzerinde yürütüldüğünden, özellikle kan örneklerinin alınma zamanlarında hastalık sürecinin bire bir aynı zaman diliminde olabilmesi mümkün değildir. Yine deneysel bir çalışma olmadığından sitokin ve D vitamini metabolitlerinde hastalığın başlangıcından itibaren gelişim sürecinde meydana gelen değişimler kaydedilememiştir. Ancak deneysel oluşturulan enfeksiyonlarda bile hastalığın şiddeti, süresi ve klinik semptomların benzerliği bakımından oldukça fazla farklılık bulunduğu göz önüne alındığında, bu çalışmada klinik belirtileri birbirine benzer olan doğal enfeksiyonlu buzağılardan elde edilen değerlerin hastalıkların seyri sırasındaki durumu önemli ölçüde yansıttığı düşünülmektedir. Sitokinlerin yarı ömürlerinin kısa olması nedeniyle dolaşımdaki düzeylerinin değişkenlik gösterdiği bilinmektedir. Bu çalışmada mümkün olduğunca fazla sayıda inflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokin analizi yapılarak değerlendirmelerin bireysel değişimlere bağlı kalmaktan ziyade daha geniş bir perspektiften yapılabilmesi sağlanmaya çalışılmıştır.

Flores-Villalva ve ark. (200) klinik olarak sağlıklı buzağılarda dolaşımdaki 25-D düzeyleri ile nötrofil, eozinofil ve bazofil sayıları arasında negatif korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Hasta kedilerde yapılan benzer bir çalışmada da 25-D ve nötrofil sayısı arasında negatif korelasyon olduğu bildirilmiş ancak 25-D seviyesindeki düşüşün sebep mi yoksa sonuç mu olduğunu ortaya konulamamıştır (88). Sığırlarda serum 25-D düzeyi ile sütteki somatik hücrelerinde bulunan IL-1 β ve defensinler arasında pozitif yönde korelasyon olduğu ayrıca oral yolla 25-D tedavisinin mastitise karşı korunmayı arttırdığı ve hastalığın şiddetini azalttığı bildirilmiştir (225). Bu çalışmadaki tüm grupların serum 25-D ve 1,25-D düzeyleri ile sitokin konsantrasyonları arasındaki ilişkinin belirlenmesi için yapılan analiz sonuçlarına göre, Rotavirüs, Koronavirüs ve C. parvum gruplarında bazı korelasyonların olduğu ortaya konulmuştur. Rotavirüs grubunda 25-D ile IFN- γ arasında; Koronavirüs grubunda 1,25-D ile IL-2 arasında, C. parvum grubunda 25-D ile IL-17 arasında negatif yönde bir korelasyon olduğu belirlenmiştir. C. parvum grubunda 25-D ile IL-6 arasında ise pozitif yönde bir korelasyon olduğu görülmüştür. Sitokin düzeyleri ile 25-D ve 1,25-D arasındaki sebep sonuç ilişkisinin enfeksiyonların başlangıcından itibaren hastalık sürecinin farklı aşamalarında belirlenmesinin yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmada neonatal buzağı ishallerine neden olan 4 farklı patojene bağlı olarak gelişen hastalıklarda serum sitokin ve D vitamini metabolitlerinin düzeyleri belirlenmiştir. Özellikle E. coli'ye bağlı olarak şekillenen hastalıkta bazı inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinlerde artışlarla birlikte, serum 1,25-D düzeyinde de yükselme tespit edilmiştir.

Farklı enfeksiyöz etiyolojilerden kaynaklanan neonatal buzağı ishallerinde enfeksiyonun türüne bağlı olarak serum sitokin ve D vitamini düzeylerinde farklılıkların olduğu ortaya konulmuştur. D vitaminin neonatal buzağı ishallerinde immün yanıtın düzenlenmesinde etkinliğinin olabileceği kanısına varılmıştır.



7. KAYNAKLAR

1. Cho YI, Yoon KJ. An overview of calf diarrhea – infectious etiology, diagnosis and intervention. *J Vet Sci* 2014; 15(1): 1-17.
2. Abbas AK, Lichtman AH. Temel İmmünoloji: İmmün Sistemin Fonksiyonları ve Bozuklukları. Camcıoğlu G, Deniz G. (Çeviri Editörleri) 1. Baskı, İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık, 2007.
3. Lang PO, Aspinal R. Vitamin D status and the host resistance to infections: What is currently (not) understood. *Clin Ther* 2017; 39(5): 930-945.
4. Fischer S, Bauerfeind R, Czerny CP, Neumann S. Serum interleukin-6 as a prognostic marker in neonatal calf diarrhea. *J Dairy Sci* 2016; 99(8): 6563-6571.
5. Beheshtipour J, Raeeszadeh M. Evaluation of IL-10 and Pro-inflammatory cytokine profile in calves naturally infected neonatal calf diarrhea syndrome. *Arch Razi Inst* 2020; 75(2): 213-218.
6. Kırbas A, Kandemir FM, Celebi D, Hanedan B, Timurkan MO. The use of inflammatory markers as a diagnostic and prognostic approach in neonatal calves with septicemia. *Acta Vet Hung* 2019; 67(3): 360-376.
7. Pourfajar M, Badiei K, Nazifi S. Acute phase response in holstein dairy calves affected with diarrhoea. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 2011; 14(3): 142-149.
8. Fayer R, Gasbarre L, Pasquali P, et al. Cryptosporidium parvum infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. *Int J Parasitol* 1998; 28(1): 49-56.
9. Ozalp T, Erdogan H. Evolution of 25(OH)D3 concentrations in neonatal calves with diarrhea. *Kocatepe Vet J* 2019; 12(3): 1-9.
10. Klostermann L. Immune System. 1st Edition, New York: Marshall Cavendish Benchmark, 2009.
11. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 2010; 327(5963): 291-295.
12. Rote NS. Adaptive Immunity. In: Huether SE, McCance KL (Editors), Chapter 6, Understanding Pathophysiology 5th Edition, St. Louis, Missouri: Elsevier Mosby Inc 2012: 118-164.
13. Calder PC. Immunological parameters: what do they mean? *J Nutr* 2007; 137(3): 773-780.
14. Owen JA, Punt J, Stanford SA, Jones PP. Kuby Immunology 7th Edition, New York: W.H. Freeman and Company, 2007.
15. Pallister CJ, Dunn CD. Progress in Haematology (Vol.2). Cambridge University Press, 2000.

16. Swain SL, McKinstry KK, Strutt TM. Expanding roles for CD4⁺ T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Imm* 2012; 12(2): 136-148.
17. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, et al. Development of TH1 CD4⁺T cells through IL-12 produced by listeria-induced macrophages. *Science* 1993; 260(5107): 547-549.
18. Haanen JB, de Waal Malefijt R, Res PC, et al. Selection of a human T helper type 1-like T cell subset by mycobacteria. *J Exp Med* 1991; 174(3): 583-592.
19. Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, et al. Differential roles of interleukin-17A and-17F in host defence against mucosal bacterial infection and allergic responses. *Immunity* 2009; 30(1): 108-119.
20. Tizard IR. *Veterinary Immunology* 9th Ed. Philadelphia: Saunders, 2012.
21. Komori HK, Meehan TF, Havran WR. Epithelial and mucosal gamma delta T cells. *Curr Opin Immunol* 2006; 18(5): 534-538.
22. Guzman E, Hope J, Taylor G, et al. Bovine $\gamma\delta$ T cells are a major regulatory T cell subset. *J Immunol* 2014; 193(1): 208-222.
23. Baldwin CL, Tefler JC. The bovine model for elucidating the role of $\gamma\delta$ T cells in controlling infectious diseases of importance to cattle and humans. *Mol Immunol* 2015; 66(1): 35-47.
24. Davis WC, Brown WC, Hamilton MJ, et al. Analysis of monoclonal antibodies specific for the gamma delta TcR. *Vet Immunol Immunopathol* 1996; 52(4): 275-283.
25. Hein WR, Mackay CR. Prominence of gamma delta T cells in the ruminant immune system. *Immunol Today* 1991; 12(1): 30-34.
26. Baquero MM, Plattner BL. Bovine WC1⁺ and WC1^{neg} $\gamma\delta$ T lymphocytes influence monocyte differentiation and monocyte-derived dendritic cell maturation during in vitro *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection. *Front Immunol* 2017; 8:534.
27. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat Rev Immunol* 2013; 13(2): 88-100.
28. Amatya N, Childs EE, Cruz JA, et al. IL-17 integrates multiple self-reinforcing, feed-forward mechanism through the RNA binding protein Arid5a. *Sci Signal* 2018; 11(551).
29. Castro F, Cardoso AP, Gonçalves RM, Serre K, Oliveira MJ. Interferon-Gamma at the crossroad of tumor immune surveillance or evasion. *Front Immunol* 2018; 9:847.
30. Dembic Z. *The cytokines of the immune system: The role of cytokines in diseases related to immune response*. 1st Edition, New York: Elsevier, 2015.
31. Karlsson I. *Cytokines as Diagnostic Biomarkers of Canine Pyometra and Sepsis*. Doctoral Thesis, Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 2015.
32. De Weerd NA, Nguyen T. The interferons and their receptors-distribution and regulation. *Immunol Cell Biol* 2012; 90(5): 483-491.
33. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 2012; 119(3) : 651-665.

34. Holbrook J, Lara-Reyna S, Jarosz-Griffiths H, McDermott M. Tumor necrosis factor signalling in health and disease. *F1000Res* 2019; 8: F1000 Faculty Rev-111.
35. Fields JK, Günther S, Sundberg EJ. Structural basis of IL-1 family cytokine signaling. *Front Immunol* 2019; 10:1412.
36. Spolsky R, Li P, Leonard WJ. Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy. *Nat Rev Immunol* 2018; 18(10): 648-659.
37. Bao K, Reinhardt RL. The differential expression of IL-4 and IL-13 and impact on type-2 immunity. *Cytokine* 2015; 75(1): 25-37.
38. Pelaia C, Paoletti G, Puggioni F, et al. Interleukin-5 in the pathophysiology of severe asthma. *Front Physiol* 2019; 10:1514.
39. Scheller J, Garbers C, Rose-John S. Interleukin-6: from basic biology to selective blockade of proinflammatory activities. *Semin Immunol* 2014; 26(1): 2-12.
40. Saraiva M, Vieira P, O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med* 2020; 217(1): e20190418.
41. Vignali DA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol* 2012; 13(8): 722-728.
42. Junttila IS. Tuning the cytokine responses: An update on interleukin (IL)-4 and IL-13 receptor complexes. *Front Immunol* 2018; 9:888.
43. Cortese VS. Neonatal Immunology. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2009; 25(1): 221-227.
44. Sherwin G, Down PM. Calf immunology and the role of vaccinations in dairy calves. In *Practice* 2018; 40(3): 102-114.
45. Costa JFDR, Novo SMF, Baccili CC, et al. Specific immune response in neonate holstein calves fed fresh or frozen colostrum. *Pesq Vet Bras* 2017; 37(12): 1385-1394.
46. Mee JF, Jawor P, Stefaniak T. Role of infection and immunity in bovine perinatal mortality: Part 2. Fetomaternal response to infection and novel diagnostic perspectives. *Animals* 2021; 11(4): 1033.
47. Yasuda M, Fujino M, Nasu T, Marukami T. Histological study on the ontogeny of bovine gut associated lymphoid tissue: appearance of T cells and development of IgG⁺ and IgA⁺ cells in lymphoid cells in lymphoid follicles. *Dev Comp Immunol* 2004; 28(4):357-369.
48. Chase CCL, Hurley DJ, Reber AJ. Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2008; 24(1): 87-104.
49. Vlasova AN, Saif LJ. Bovine immunology: Implications for dairy cattle. *Front Imm* 2021; 12:643206.
50. McGill JL, Sacco RE. The Immunology of bovine respiratory disease. *Vet Clin North Am Food Pract* 2020; 36(2): 333-348.
51. McGill JL, Sacco RE, Baldwin CL, et al. The role of gamma delta T cells in immunity to *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 2014; 159(3-4): 133-143.

52. Wu YL, Ding YP, Tanaka Y, et al. $\gamma\delta$ T cells and their potential for immunotherapy. *Int J Biol Sci* 2014; 10(2): 119-135.
53. Girard P, Ponsard B, Charles J, Chaperot L, Asford C. Potent bidirectional cross-talk between plasmacytoid dendritic cell and $\gamma\delta$ T cells through BTN3A, type I/II IFNs and immune checkpoints. *Front Immunol* 2020; 11:861.
54. Guzman E, Price S, Poulsom H, Hope J. Bovine $\gamma\delta$ T cells: cells with multiple functions and important roles in immunity. *Vet Immunol Immunopathol* 2012; 148(1-2): 161-167.
55. Albarrak SM, Waters WR, Stabel JR, Hostetter JM. Evaluating the cytokine profile of the WC1+ $\gamma\delta$ T cell subsets in the ileum of the cattle with the subclinical and clinical forms of MAP infection. *Vet Immunol Immunopathol* 2018; 201:26-31.
56. Kampen AH, Olsen I, Tollersrud T, Storset AK, Lund A. Lymphocyte subpopulations and neutrophil functions in calves during first 6 months of life. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 113(1-2): 53-63.
57. Nonnecke BJ, Waters WR, Foote MR, et al. Development of an adult-like cell-mediated immune response in calves after early vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *J Dairy Sci* 2005; 88(1): 195-210.
58. Nonnecke BJ, Waters WR, Goff JP, Foote MR. Adaptive immunity in the colostrum deprived calves: Response to early vaccination with *Mycobacterium bovis* strain bacille calmette Guerin and ovalbumin. *J Dairy Sci* 2012; 95(1): 221-239.
59. Buddle BM, Wedlock DN, Parlane NA, et al. Revaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG reduces the level of protection against bovine tuberculosis induced by a single vaccination. *Infect Immun* 2003; 71(11): 6411-6419.
60. Endsley JJ, Roth JA, Ridpath J, Neill J. Maternal antibody blocks humoral but not T cell responses to BVDV. *Biologicals* 2003; 31(2): 123-125.
61. DeLuca HF. Historical Overview of Vitamin D. In Feldman D (Editor). *Vitamin D: Volume one. Biochemistry, Physiology and Diagnostic* 4th Edition, London: Elsevier 2018: 3-12.
62. Jeon SM, Shin EA. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. *Exp Mol Med* 2018; 50(4): 1-14.
63. Selveraj P, Harishankar M, Afsal K. Vitamin D: Immuno-modulation and tuberculosis treatment. *Can J Physiol Pharmacol* 2015; 93(5): 377-384.
64. Nelson CD, Lippolis JD, Reinhardt TA, et al. Vitamin D status of dairy cattle: Outcomes of current practices in dairy industry. *J Dairy Sci* 2016; 99:1-11.
65. Zafalon RVA, Risolia LW, Pedrinelli V. Vitamin D metabolism in dogs and cats and its relation to diseases not associated with bone metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2020; 104: 322-342.
66. Bikle DD. Vitamin D biochemistry and physiology. In: Liao EP (Editor). *Extraskeletal Effects of Vitamin D: A Clinical guide*. New York: Humana Press 2018: 1-40.

67. de Brito Galvao JF, Nagode LA, Schenk PA, Chew DJ. Calcitriol, calcidiol, parathyroid hormone, and fibroblast growth factor-23 interactions in chronic kidney disease. *J Vet Emerg Crit Care* 2013; 23(2): 134-162.
68. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. *Physiol Rev* 2015; 96(1): 365-408.
69. Bikle DD. Extra renal synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D and its health implications. *Clinic Rev Bone Miner Metab* 2009; 7(2):114-125.
70. Pike JW, Christakos S. Biology and mechanism of action of the vitamin D hormone. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2017; 46(4): 815-843.
71. Bikle DD, Schwartz J. Vitamin D binding protein, total and free vitamin D levels in different physiological and pathophysiological conditions. *Front Endocrinol* 2019; 10(317).
72. Saponaro F, Saba A, Zucchi R. An update on vitamin D metabolism. *Int J Mol Sci* 2020; 21(18): 6573.
73. Bouillon R, Carmeliet G. Vitamin D insufficiency: Definition, diagnosis and management. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2018; 32(5): 669-684.
74. Khundmiri SJ, Murray RD, Lederer E. PTH and Vitamin D. *Compr Physiol* 2016; 6(2): 561-601.
75. Blaine J, Choncol M, Levi M. Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015; 10(7): 1257-1272.
76. Wimalawansa SJ. Non-musculoskeletal benefits of vitamin D. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2018; 175: 60-81.
77. Lerner DP, Adams JS, Hewison M. Regulation of renal and extrarenal 1α -hydroxylase. In Feldman D (Editor) *Vitamin D* 4th edition, London: Elsevier 2018: 117-137.
78. Hermann M, Farrell CL, Pusceddu I, Fabregat-Cebello N, Cavalier E. Assessment of vitamin D status-a changing landscape. *Clin Chem Lab Med* 2017; 55(1):3-26.
79. Dabak M, Dabak DO, Kuloglu T, et al. Increased circulatory extrarenal $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ in bilaterally nephrectomized rats. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2020; 20(9): 1523-1530.
80. Medrano M, Carillo-Cruz E, Montero I, Perez-Simon JA. Vitamin D: Effect on haematopoiesis and immune system and clinical applications. *Int J Mol Sci* 2018; 19(9): 2663.
81. Bouillon R, Marcocci C, Carmeliet G, et al. Skeletal and extraskeletal actions of vitamin D: Current evidence and outstanding questions. *Endocr Rev* 2018; 40(4): 1109-1151.
82. Prietl B, Treiber G, Pieber TR, Amrein K. Vitamin D and immune function. *Nutrients* 2013; 5(7): 2502-2521.
83. Chirumbolo S, Björklund G, Sboarina A, Vella A. The role of Vitamin D in the immune system as a pro-survival molecule. *Clin Ther* 2017; 39(5): 894-916.

84. Liu W, Zhang L, Xu HJ, et al. The anti inflammatory effects of vitamin D in tumorigenesis. *Int J Mol Sci* 2018; 19(9): 2736.
85. Kruit A, Zanen P. The association between vitamin D and C-reaktif protein levels in patients with inflammatory and non-inflammatory diseases. *Clin Biochem* 2016; 49(7-8): 534-537.
86. Kim DH, Meza CA, Clarke H, Kim JS, Hickner RC. Vitamin D and endothelial function *Nutrients* 2020; 12(2): 575.
87. Smith EM, Alvarez JA, Kearns MD, et al. High dose vitamin D3 reduces circulating hepcidin concentrations: A pilot, randomised, double blind, placebo controlled trial in healthy adults. *Clin Nutr* 2017; 36(4): 980-985.
88. Titmarsh HF, Gow AG, Kilpatrick S, et al. Low vitamin D status is associated with systemic and gastrointestinal inflammation in dogs with a chronic enteropathy. *PLoS One* 2015; 10(9) e0137377.
89. Khoo AL, Chai LY, Koenen HJ, et al. Vitamin D(3) down-regulates proinflammatory cytokine response to *Mycobacterium tuberculosis* through pattern recognition receptors while inducing protective cathelicidin production. *Cytokine* 2011; 55(2): 294-300.
90. Verway M, Bouttier M, Wang TT, et al. Vitamin D induces interleukin-1 β expression: Paracrine macrophage epithelial signaling controls *M. tuberculosis* infection. *PLoS Pathog* 2013; 9(6) e1003407.
91. Zhang Y, Leung DYM, Richers BN, et al. Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. *J Immunol* 2012; 188(5): 2127-2135.
92. Jaffey JA, Amorim J, DeClue AE. Effect of calcitriol on in vitro whole blood cytokine production in critically ill dogs. *Vet J* 2018; 236: 31-36.
93. Adams JS, Rafison B, Witzel S, et al. Regulation of the extrarenal CYP27B1-hydroxylase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014; 144: 22-27.
94. Bishop EL, Ismailova A, Dimeloe SK, Hewison M, White JH. Vitamin D and immune regulation: antibacterial, antiviral, anti-Inflammatory. *JBMR Plus* 2020; 5(1): e10405.
95. Zavala K, Vazirnia A, Liu PT. Vitamin D and innate immunity. In: Feldman D (Editor). *Vitamin D*. 4th Edition, London: Elsevier 2018; 951-967.
96. Liu PT, Stenger S, Li H, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006; 311(5768): 1770-1773.
97. Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immun* 2004; 173(5): 2909-2912.
98. Charoenngam N, Holick MF. Immunologic effects of vitamin D on human health and disease. *Nutrients* 2020; 12(7): 2097.
99. Koenimger L, Armbruster NS, Brinch KS, et al. Human β defensin 2 mediated immune modulation as treatment for experimental colitis. *Front Immunol* 2020; 11:93.

100. Hewison M. Vitamin D and immune function: An overview. *Proc Nutr Soc* 2012; 71(1): 50-61.
101. Vanherwegen AS, Gysemans C, Mathieu C. Regulation of immune function by vitamin D and its use in diseases of immunity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2017; 46(4): 1061-1094.
102. Takahashi K, Nakayama Y, Horiuchi H, et al. Human neutrophils express messenger RNA of vitamin D receptor and respond to 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2002; 24(3): 335-347.
103. Dimitrov V, White JH. Vitamin D signaling in intestinal innate immunity and homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* 2017; 453: 68-78.
104. Hernigou P, Sitbon J. Vitamin D history part III: the "modern times"- new questions for orthopaedic practice: deficiency, cell therapy, osteomalacia, fractures, supplementations, infections. *International Orthopaedics* 2019; 43(9): 1-17.
105. Nelson CD, Reinhardt TA, Thacker TC, Beitz DC, Lippolis JD. Modulation of the bovine innate immune response by production of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3) in bovine monocytes. *J Dairy Sci* 2010; 93(3): 1041-1049.
106. Vanherwegen AS, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D endocrinology on the cross-road between immunity and metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 2017; 453: 52-67.
107. Barragan M, Good M, Kolls JK. Regulation of dendritic cell function by vitamin D. *Nutrients*. 2015; 7(9): 8127-8151.
108. Flanagan PK, Chiewchengchol D, Wright HL, et al. Killing of *Escherichia coli* by Crohn's Disease monocyte-derived macrophages and its enhancement by hydroxychloroquine and vitamin D. *Inflamm Bowel Dis* 2015; 21(7): 1499-1510.
109. Corripio-Miyar Y, Mellanby RJ, Morrison K, McNeily TN. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ modulates the phenotype and function of monocyte derived dendritic cells in cattle. *BMC Vet Res* 2017; 13: 390.
110. Cantorna MT, Waddell A. Vitamin D receptors turns off chronically activated T cells. *Ann NY Acad Sci* 2014; 1317: 70-75.
111. Guillot X, Semerano L, Saldenberg-Kermanac'h N, Falgarone G, Boissier MC. Vitamin D and inflammation. *Joint Bone Spine* 2010; 77(6): 552-557.
112. Palmer MT, Lee YK, Maynad CL, et al. Lineage-specific effects of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) on the development of effector CD4 T cells. *J Biol Chem* 2011; 286(2): 997-1004.
113. Cantorna MT, Snyder L, Lin YD, Yang L. Vitamin D and 1,25(OH)₂D regulation of T cells. *Nutrients* 2015; 7(4): 3011-3021.
114. Ryz NR, Patterson SJ, Zhang Y, et al. Active vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D₃) increases host susceptibility to *Citrobacter rodentium* by suppressing mucosal Th-17 responses. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; 303(12): G1299-1311.

115. Chun RF, Shieh A, Gottlieb C, et al. Vitamin D binding protein and the biological activity of vitamin D. *Front Endocrinol* 2019; 10:718.
116. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, et al. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol* 2001; 167(9): 4974-4980.
117. Veldman C, Cantorna MT, DeLuca HF. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system. *Arch Biochem Biophys* 2000; 374(2): 334-338.
118. Meehan TF, DeLuca HF. CD8(+) cells are not necessary for 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3) to suppress experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99(8): 5557-5560.
119. Chen S, Sims GP, Chen XX, et al. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J Immunol* 2007; 179(3): 1634-1647.
120. Heine G, Niesner U, Chang HD, Steinmeyer A, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) promotes IL-10 production in human B cells. *Eur J Immunol* 2008; 38(8): 2210-2218.
121. Heine G, Anton K, Henz BM, Worm M. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits anti-CD40 plus IL-4 mediated IgE production in vitro. *Eur J Immunol* 2002; 32(12): 3395-3404.
122. Lee C, Lau E, Chusilp S, et al. Protective effects of vitamin D against injury in intestinal epithelium. *Pediatr Surg Int* 2019; 35(12): 1395-1401.
123. Assa A, Vong L, Pinnell LJ, et al. Vitamin D deficiency promotes epithelial barrier dysfunction and intestinal inflammation. *J Infect Dis* 2014; 210(8): 1296-1305.
124. Clancy N, Onwuneme C, Carrol A, et al. Vitamin D and neonatal immune function. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013; 26(7): 639-646.
125. Rhodes SG, Terry LA, Hope J, Hewinson RG, Vordermeier HM. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and development of tuberculosis in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10(6): 1129-1135.
126. Blaney GP, Albert PJ. Vitamin D metabolites as clinical markers in autoimmune and chronic disease. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1173: 384-390.
127. Dabak M, Dabak DO, Karapinar T, Bulut H. Vitamin D status in cattle with malignant catarrhal fever. *J Vet Med Sci* 2012; 74(1): 125-128.
128. Nonnecke BJ, McGill JL, Ridpath JF, et al. Acute phase response elicited by experimental bovine diarrhea virus (BVDV) infection is associated with decreased vitamin D and E status of vitamin-replete preruminant calves. *J Dairy Sci* 2014; 97(9): 5566-5579.
129. Camkerten G, Erdogan H, Alic Ural D, et al. Levels of serum 25(OH)D3 in naturally infected lambs with giardia duodenalis. *Kocatepe Vet J* 2019; 12(1): 71-74.
130. Lippolis JD, Reinhardt TA, Sacco RA, Nonnecke BJ, Nelson CD. Treatment of intramammary bacterial infection with 25-Hydroxyvitamin D(3). *PLoS One* 2011; 6(10): e25479.

131. Cazzolli DM, Prittie JE, Fox PR, Lamb K. Evaluation of serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in a heterogenous canine ICU population. *J Vet Emerg Crit Care* 2019; 29(6): 605-610.
132. Heures N. Vitamin D testing-Where are we and what is on the horizon? *Adv Clin Chem* 2017; 78: 59-101.
133. Volmer DA, Mendes L, Stokes CS. Analysis of vitamin D metabolic markers by mass spectrometry: Current techniques, limitations of the "gold standard" method, and anticipated future directions. *Mass Spectrom Rev* 2015; 34(1): 2-23.
134. Foster DM, Smith GW. Pathophysiology of diarrhea in calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2009; 25(1): 13-36.
135. Smith P. *Large Animal Internal Medicine*. 5th Edition, St. Louis: Elsevier Mosby. 2015.
136. Berber E, Canakoglu N, Sozdutmaz I, et al. Seasonal and age-associated pathogen distribution in newborn calves with diarrhea admitted to ICU. *Vet Sci* 2021; 8(7): 128.
137. Heller MC, Chigerwe M. Diagnosis and treatment of infectious enteritis in neonatal and juvenile ruminants. *Vet Clin Food Anim* 2018; 34(1): 101-117.
138. Smith G, Berchtold J. Fluid therapy in calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2014; 30(2): 409-427.
139. Divers TJ, Peek SF. *Rebhun's Diseases of Cattle*. 2nd Edition, St. Louis: Saunders Elsevier, 2008.
140. Kolenda R, Burdukiewicz, Schierack P. A systematic review and metaanalysis of the epidemiology of pathogenic *E. coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. *Front Cell Infect Microbiol* 2015; 5:23.
141. Blanchard PC. Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2012, 28(3): 443-464 .
142. Sohn EJ, Paape MJ, Connor EE, et al. Bacterial lipopolysaccharide stimulates bovine neutrophil production of TNF-alpha, IL-1beta, IL-12 and IFN-gamma. *Vet Res* 2006; 38(6): 809-818.
143. Roussel P, Cunha P, Porcherie A, et al. Investigating the contribution of IL-17A and IL-17F to the host response during *Escherichia coli* mastitis. *Vet Res* 2015; 46(1): 56.
144. Schlieckau F, Schulz D, Malfertheiner SF, et al. A novel model to study neonatal *Escherichia coli* sepsis and the effect of the treatment on the human immune system using humanized mice. *Am J Reprod Immunol* 2017; 80(1).
145. Chen L, Eapen MS, Zosky GR. Vitamin D both facilitates and attenuates the cellular response to lipopolysaccharide. *Sci Rep* 2017; 27(7): 45172.
146. Rocha TG, Silva FDF, Gregori F, et al. Longitudinal study of bovine rotavirus group A in newborn calves from vaccinated and unvaccinated dairy herds. *Trop Anim Health Prod* 2017; 49(4): 783-790.
147. Dhama K, Chaunhan RS, Mahendran M, Malik SVS. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. *Vet Res Commun* 2009; 33(1): 1-23.

148. Chauhan RS, Dhama K, Mahendran M. Pathobiology of rotaviral diarrhea in calves and its diagnosis and control: A review. *J Immunol Immunopathol* 2008; 10(1): 1-13.
149. Boshuizen JA, Reimerink JHJ, Korteland-van Male AM, et al. Changes in small intestinal homeostasis, morphology and gene expression during rotavirus infection of infant mice. *J Virol* 77; 77(24): 13005-13016.
150. Reading PC, Holmskov U, Anders EM. Antiviral activity of bovine collectins against rotaviruses. *J Gen Virol* 1998; 79(9): 2255-2263.
151. Azevedo MS, Yuan L, Pouly S, et al. Cytokine responses in gnotobiotic pigs after infection with virulent or attenuated human rotavirus. *J Virol* 2006; 80(1): 372-382.
152. Raabis SM, Ollivett TL, Cook ME, Sand JM, McGuirk SM. Health benefits of orally administered anti-IL-10-antibody in milk-fed dairy calves. *J Dairy Sci* 2018; 101(8): 7375-7382.
153. Huang H, Liao D, Zhou G, et al. Antiviral activities of resveratrol against rotavirus in vitro and in vivo. *Phytomedicine* 2020; 77:153230.
154. Zhao Y, Yu B, Mao X, et al. Effect of 25-hydroxyvitamin D3 on rotavirus replication and gene expressions of RIG-1 signalling molecule in porcine rotavirus-infected IPEC-J2 cells. *Arch Anim Nutr* 2015; 69(3): 227-235.
155. Zhao Y, Yu B, Mao X, et al. Dietary vitamin D supplementation attenuates immune responses of pigs challenged with rotavirus potentially through retinoic-acid inducible gene I signalling pathway. *Br J Nutr* 2014; 112(3): 381-389.
156. Bucak IH, Ozturk AB, Almis H, et al. Is there a relationship between low vitamin D and rotaviral diarrhea? *Pediatr Int* 2016; 58(4): 270-273.
157. Peng G, Xu L, Lin YL, et al. Crystal structure of bovine coronavirus spike protein lectin domain. *J Biol Chem* 2012; 287(50): 41931-41938.
158. Bidokhti MRM, Traven M, Krishna NK, et al. Evolutionary dynamics of bovine coronaviruses: naturel selection pattern of the spike gene implies adaptive evolution of the strains. *J Gen Virol* 2013; 94(9): 2036-2049.
159. Hodnik JJ, Ježek J, Starič J. Coronaviruses in cattle. *Tropical Animal Health and Production* 2020; 52: 2809-2816.
160. Gomez DE, Weese JS. Viral enteritis in calves. *Can Vet J* 2017; 58(12): 1267-1274.
161. Boileau MJ, Kapil S. Bovine coronavirus associated syndromes. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2010; 26(1): 123-146.
162. Gomez DE, Arryo LG, Poljac Z, Viel L, Weese JS. Detection of bovine coronavirus in healthy and diarrheic calves. *J Vet Intern Med* 2017; 31(6): 1884-1891.
163. Kanno T, Ishihara R, Hatama S, Uchida I. A long term animal experiment indicating persistent infection of bovine coronavirus in cattle. *J Vet Med* 2018; 80(7): 1134-1137.
164. Ghelani D, Alesi S, Mousa A. Vitamin D and COVID-19: an overview of recent evidence. *Int J Mol Sci* 2021; 22(19): 10559.

165. De Smet D, D Smet K, Herroelen P, et al. Serum 25(OH)D level on admission associated with COVID-19 stage and mortality. *Am J Clin Pathol* 2021; 155(3): 381-388.
166. Meltzer DO, Best TJ, Zhang H, et al. Association of vitamin D status and other clinical characteristics with COVID-19 test results. *JAMA Netw Open* 2020; 3(9): e2019722.
167. Karahan S, Katkat F. Impact of serum 25(OH) Vitamin D level on mortality in patients with COVID-19 in Turkey. *J Nutr Health Aging* 2021; 25(2): 189-196.
168. Jevalikar G, Mithal A, Singh A, et al. Lack of association of baseline 25-hydroxyvitamin D levels with disease severity and mortality in Indian patients hospitalized for COVID-19. *Sci Rep* 2021; 11:6258.
169. Orchard L, Baldry M, Nasim-Mohi M. Vitamin D levels and intensive care unit outcomes of a cohort of critically ill COVID-19 patients. *Clin Chem Lab Med* 2021; 59(6): 1155-1163.
170. Evermann JF, Benfield DA. Coronaviral Infections. In Williams ES, Barker IK (Editors). *Infectious Diseases of Wild Mammals*. 3th edition, Iowa: Wiley-Blackwell 2001: 245-253.
171. Thomson S, Hamilton CA, Hope JC, et al. Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control strategies. *Vet Res* 2017; 48(1): 42.
172. Lendner M, Dauschies A. Cryptosporidium infections: molecular advances. *Parasitology* 2014; 141(11): 1511-1532.
173. Santin M, Trout JM, Fayer R. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Vet Parasitol* 2008; 155(1-2): 15-23.
174. Bouzid M, Hunter PR, Chalmers RM, Tyler KM. Cryptosporidium pathogenicity and virulence. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26(1): 115-134.
175. O'Hara SP, Bogert PS, Trussoni CE, Chen X, LaRusso NF. TLR4 promotes Cryptosporidium parvum clearance in a mouse model of biliary cryptosporidiosis. *J Parasitol* 2011; 97(5): 813-821.
176. Gookin JL, Chiang S, Alle J, et al. NF-kappa-mediated expression of iNOS promotes epithelial defence against infection by Cryptosporidium parvum in neonatal piglets. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 290(1): G164-174.
177. Theodos CM, Sullivan KL, Griffiths JK, Tzipori S. Profiles of healing and nonhealing Cryptosporidium parvum infection in C57BL/6 mice with functional B and T lymphocytes: The extent of gamma interferon modulation determines the outcome of infection. *Infect Immun* 1997; 65(11): 4761-4769.
178. Urban JF Jr, Fayer R, Chen SJ, et al. IL-12 protects immunocompetent and immunodeficient neonatal mice against infection with Cryptosporidium parvum. *J Immunol* 1996; 156(1): 263-268.
179. Barakat FM, McDonald V, Di Santo JP, Korbel DS. Roles for NK cells and an NK cell-independent source of intestinal gamma interferon for innate immunity to Cryptosporidium parvum infection. *Infect Immun* 2009; 77(11): 5044-5049.

180. Campbell LD, Stewart JN, Mead JR. Susceptibility to *Cryptosporidium parvum* infections in cytokine-and chemokine-receptor knockout mice. *J Parasitol* 2002; 88(5): 1014-1016.
181. Li S, Li W, Yang Z, et al. Infection of cattle with *Cryptosporidium parvum*: Mast cell accumulation in small intestine mucosa. *Vet Pathol* 2013; 50(5): 842-848.
182. Zhao GH, Fang YQ, Ryan U, et al. Dynamics of Th17 associating cytokines in *Cryptosporidium parvum*-infected mice. *Parasitol Res* 2016; 115(2): 879-887.
183. Robinson P, Okhuysen PC, Chappell CL, et al. Expression of tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 beta in jejuna of volunteers after experimental challenge with *Cryptosporidium parvum* correlates with exposure but not with symptoms. *Infect Immun* 2001; 69(2): 1172-1174.
184. Lean IS, Lacroix-Lamandé S, Laurent F, McDonald V. Role of tumor necrosis factor alpha in development of immunity against *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun* 2006; 74(7): 4379-4382.
185. Drinkall E, Wass MJ, Coffey TJ, Flynn RJ. A rapid IL-17 response to *Cryptosporidium parvum* in the bovine intestine. *Vet Immunol Immunopathol* 2017; 191: 1-4.
186. Singh I, Theodos C, Li W, Tzipori S. Kinetics of *Cryptosporidium parvum*-specific cytokine responses in healing and nonhealing murine models of *C. parvum* infection. *Parasitol Res* 2005; 97(4): 309-317.
187. Olias P, Dettwiler I, Hemphill A, et al. Die bedeutung der Cryptosporidiose für die kälbergesundheit in der Schweiz *SAT* 2018; 160(6): 363-374.
188. Coles EH. *Veterinary Clinical pathology* 4th Ed. Philadelphia and London: W.B. Saunders Co., 1986.
189. Ackerman MR, Derscheid R, Roth JA. Innate immunology of bovine respiratory disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2010; 26(2): 215-228.
190. Lieber-Tenorio EM, Riedel-Caspari G, Pohlenz JF. Uptake of colostral leukocytes in the intestinal tract of newborn calves. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 85(1-2): 33-40.
191. Riedel-Caspari G. The influence of colostral leukocytes on the course of an experimental *Escherichia coli* infection and serum antibodies in neonatal calves. *Vet Immunol Immunopathol* 1993; 35(3-4): 275-288.
192. Menge C, Neufeld B, Hirt W, et al. Compensation of preliminary blood phagocyte immaturity in newborn calves. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 62(4): 309-321.
193. Kim S, Yu DH, Jung S. Biological factors associated with infectious diarrhea in calves. *Pakistan Veterinary Journal* 2021; 41(4): 531-537.
194. Goff JP, Horst RL, Littledicke ET. Effect of the maternal vitamin D status at parturition on the vitamin D status of the neonatal calf. *J Nutr* 1982; 112(7): 1387-1393.
195. Weiss WP, Azem E, Steinberg W, Reinhardt TA. Effect of feeding 25-hydroxyvitamin D3 with a negative cation-anion difference diet on calcium and vitamin D status of periparturient cows and their calves. *J Dairy Sci* 2015; 98(8): 5588-5600.

196. Nelson CD, Powell JL, Price DM, et al. Assessment of serum 25-hydroxyvitamin D concentrations of beef cows and calves across seasons and geographical locations. *J Anim Sci* 2016; 94(9): 3958-3965.
197. Erdogan S, Ural K, Erdogan H, et al. Interpretation of 25-OH-D3, NEFA, and calcium correlations among cow and calf pairs. *Medycyna weterinarna-veterinary medicine-science and practice* 2021; 77(4): 211-215.
198. Casas E, Lippolis JD, Kuehn LA, Reinhardt TA. Seasonal variation in vitamin D status of beef cattle reared in the central United States. *Domest Anim Endocrinol* 2015; 52: 71-74.
199. Callaby R, Hurst E, Handel I, et al. Determinant of vitamin D status in Kenyan calves. *Sci Rep* 2020; 10(1): 20590.
200. Flores-Villalva S, O'Brien MB, Reid C, et al. Low serum vitamin D concentrations in Spring-born dairy calves are associated with elevated peripheral leukocytes. *Sci Rep* 2021; 11:18969.
201. Muhe L, Lulseged S, Mason KE, Simoes EAF. Case-control study of the role of nutritional rickets in the risk of developing pneumonia in Ethiopian children. *Lancet* 1997; 349(9068): 1801-1804.
202. Camargo CA Jr, Ingham T, Wickens K, et al. Cord-blood 25-hydroxyvitamin D levels and risk of respiratory infection, wheezing, and asthma. *Pediatrics* 2011; 127(1): 180-187.
203. Sabetta JR, DePetrillo P, Cipriani RJ, et al. Serum 25-hydroxyvitamin d and the incidence of acute viral respiratory tract infections in healthy adults. *PloS One* 2010; 5(6): 11088.
204. Laaksi I, Ruohola JP, Tuohimaa P, et al. An association of serum vitamin D concentrations <40 nmol/ml with acute respiratory tract infection in young Finnish men. *Am J Clin Nutr* 2007; 86(3): 714-717.
205. Li-Ng M, Aloia JF, Pollack S, et al. A randomized controlled trial of vitamin D3 supplementation for the prevention of symptomatic upper respiratory tract infections. *Epidemiol Infect* 2009; 137(10): 1396-1404.
206. Murdoch DR, Slow S, Chambers ST, et al. Effect of vitamin D3 supplementation on upper respiratory tract infections in healthy adults: the VIDARIS randomized controlled trial. *JAMA* 2012; 308(13): 1333-1339.
207. Urashima M, Segawa T, Okazaki M, et al. Randomized trial of vitamin D supplementation to prevent seasonal influenza A in schoolchildren. *Am J Clin Nutr* 2010; 91(5): 1255-1260.
208. Camargo CA Jr, Ganmaa D, Frazier AL, et al. Randomized trial of vitamin D supplementation and risk of acute respiratory infection in Mongolia. *Pediatrics* 2012; 130(3): e561-567.
209. Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA. Calcium and vitamin D metabolism in the dairy cow. *J. Dairy Sci* 1994; 77(7): 1936-1951.

210. Clements DN, Bruce G, Ryan JM, et al. Effects of surgery on free and total 25 hydroxyvitamin D concentrations in dogs. *J Vet Intern Med* 2020; 34(6): 2617-2621.
211. Sorge US, Molitor T, Linn J, et al. Cow-level association between serum 25-hydroxyvitamin D concentration and *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis antibody seropositivity: a pilot study. *J Dairy Sci* 2013; 96(2): 1030-1037.
212. Stabel JR, Reinhardt TA, Hempel JR. Short communication: Vitamin D status and responses in dairy cows naturally infected with *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis. *J Dairy Sci* 2019; 102(2): 1594-1600.
213. Nonnecke BJ, Reinhardt TA, Waters WR. Short communication: The preruminant calf as a model for characterizing the effects of vitamin D status in the neonate. *J Dairy Sci* 2009; 92(11): 5692-5696.
214. Rajamaran V, Nonnecke BJ, Horst RL. Effects of replacement of native fat in colostrum and milk with coconut oil on fat-soluble vitamins in serum and immune function in calves. *J Dairy Sci* 1997; 80(10): 2380-2390.
215. Kim HM, Yang JY, Upadhaya SD, et al. The stress of weaning influences serum levels of acute-phase proteins, iron-binding proteins, inflammatory cytokines, cortisol, and leukocyte subsets in Holstein calves. *J Vet Sci* 2011; 12(2): 151-157.
216. Gelsinger SL, Heinrichs AJ. Comparison of immune responses in calves fed heat-treated or unheated colostrum. *J Dairy Sci* 2017; 100(5): 4090-4101.
217. Asgarpour P, Nadealian MG, Dezfouli MRM, Eftekhari Z, Borojeni GRN. Effects of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on clinical symptoms, proinflammatory and inflammatory cytokines in calves with experimental pneumonia. *Res Vet Sci* 2019; 132: 186-193.
218. Sun P, Wang JQ, Zhang HT. Effects of *Bacillus subtilis* natto on performance and immune function of preweaning calves. *J Dairy Sci* 2010; 93(12): 5851-5855.
219. Brodzki P, Kostro K, Krakowski L, Marczuk J. Inflammatory cytokine and acute phase protein concentrations in the peripheral fluid and uterine washings of cows with subclinical endometritis in the late postpartum period. *Vet Res Commun* 2015; 39(2): 143-149.
220. Bordignon R, Volpato A, Glombowsky P, et al. Nutraceutical effects of vitamin and minerals on performance and antioxidant systems in dairy calves during the nutritional transition period in summer. *J Therm Biol* 2019; 84: 451-459.
221. El-Deeb WM, El-Bahr SM. Biomarkers of ketosis in dairy cow at postparturient period: acute phase proteins and pro-inflammatory cytokines. *Veterinary Archives* 2017; 87(4): 431-440.
222. El-Sabeai M, El-Ashker M, El-Boshy M. The role of acute phase cytokines in the recovery and disease progress of *Theileria annulata*-infected cattle. *Comp Clin Pathol* 2013; 23: 1497-1502.

223. Barigye R, Melville LF, Davis S, et al. Kinetics of selected plasma cytokines during innate-adaptive immune response transition in adult cattle infected with the bovine ephemeral fever virus. *Vet Microbiol* 2016; 186: 111-116.
224. Ballou MA, Cobb CJ, Hulbert LA, Carroll JA. Effects of intravenous *Escherichia coli* dose on the pathophysiological response of colostrum-fed Jersey calves. *Vet Immunol Immunopathol* 2011; 141(1-2): 76-83.
225. Poindexter MB, Kweh MF, Zimpel R. Feeding supplemental 25-hydroxyvitamin D3 increases serum mineral concentrations and alters mammary immunity of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2020; 103(1): 805-822.
226. Aich P, Wilson HL, Kaushik RS, et al. Comparative analysis of innate immune responses following infection of newborn calves with bovine rotavirus and bovine coronavirus. *J Gen Virol* 2007; 88(Pt10): 2749-2761.
227. Takeda K, Omata Y, Koyama T, et al. Increase of Th1 type cytokine mRNA expression in peripheral blood of calves experimentally infected with *Cryptosporidium parvum*. *Veterinary Parasitology* 2003; 113(3-4): 327-331.