

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK PATOLOJİSİ ANABİLİM DALI

KOYUNLARDA ENSEFALİTİK LİSTERİOZİS HASTALIĞINDA PATOLOJİK
VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL İNCELEMELER

Sait VARLI

VETERİNERLİK PATOLOJİSİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ADANA-2024

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK PATOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**KOYUNLARDA ENSEFALİTİK LİSTERİOZİS HASTALIĞINDA PATOLOJİK
VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL İNCELEMELER**

Sait VARLI

VETERİNERLİK PATOLOJİSİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Mehmet HALİGÜR

ADANA-2024

KABUL VE ONAY



İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÖZET	viii
ABSTRACT.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
3. GEREÇ ve YÖNTEM	8
3.1. Materyal ve Histopatoloji	8
3.2. İmmunohistokimya yöntemi.....	8
3.3. İstatiksel Analiz	9
4. BULGULAR.....	10
4.1. Makroskopik Bulgular.....	10
4.2. Mikroskopik Bulgular	10
4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular	11
5. TARTIŞMA	16
6. SONUÇ VE ÖNERİLER:.....	20
7. KAYNAKLAR	21
ÖZGEÇMİŞ	28

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam sırasında değerli katkılarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet HALIGÜR'e, Anabilim Dalımız öğretim üyelerinden Prof. Dr. Ahmet AYDOĞAN'a ve Doç. Dr. Mehmet Önder KARAYİĞİT'e; immunohistokimyasal boyamalarında desteklerini esirgemeyen Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalından Prof. Dr. Özlem ÖZMEN'e; tez süresince bilimsel öneri ve yardımlarından dolayı Çukurova Üniversitesi Ceyhan Veteriner Fakültesi öğretim üyelerinden Prof. Dr. Ayşe HALIGÜR'e; Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsüne teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmam boyunca bana yardımcı olan ve bana katlanan sevgili eşim Ayşegül VARLI'ya, kızım Asya VARLI'ya teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<i>Lm</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
8-OHdG	8-hydroxy-2' -deoxyguanosine
NaCl	Sodyum Klorür
GIS	Gastrointestinal sistemde
SSS	Santral Sinir Sistemi
Apaf-1	Apoptoz Aktive Edici Faktör 1
ATP	Adenozin Trifosfat
LLO	Listeriolysin O
NF-kB	Nükleer faktör kappa B
MAP Kinaz	Mitojenle Aktifleştirilen Protein Kinaz
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
DNA	Deoksiribonükleik Asit
OS	Oksidatif Stres
NO	Nitrik Oksit
EDRF	Endotel Kaynaklı Gevşetici Faktör
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
nNOS	Nöronal Nitrik Oksit Sentetaz
eNOS	Endotelial Nitrik Oksit Sentetaz
HxE	Hematoksilen-Eozin
IHC	Immunohistokimya
PBS	Fosfat Buffer Solüsyonu
AEC	3-amino-9-etilkarbazol
DAB	3,3' Diaminobenzidine
SD	Standart Sapma
MMP-9	Matriks Metalloproteinaz-9

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.** Hematoksilen Eozin ile histopatolojik boyama. **a)** Perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonu (oklar), listeriozis, medulla oblongata, HxE, Bar=100µm. **b)** Etkilenen bölgede mikroapse odakları (oklar), listeriozis, medulla oblongata, HxE, Bar= 25µm. 11
- Şekil 2.** Listeria antikoru ile immunohistokimyasal boyama. **a)** Listeria pozitif nöronlar (oklar) ve glial hücreler (ok başları), listeriozis, medulla oblongata IHC (AEC), Bar=100µm. **b)** Listeria pozitif perivasküler yangısal hücreler (oklar), listeriozis, medulla oblongata IHC (AEC), Bar= 25µm. 12
- Şekil 3.** GFAP immunohistokimyasal boyaması. **a)** GFAP pozitif astrositler (oklar), kontrol, medulla oblongata, listeriozis IHC (AEC), Bar=25µm. **b)** GFAP pozitif astrositler, (oklar), listeriozis, medulla oblongata, IHC (AEC), Bar=25µm. 12
- Şekil 4.** iNOS immunohistokimyasal boyaması. **a)** iNOS pozitif glial hücreler ile damar endotel hücreleri (oklar), kontrol, medulla oblongata IHC (AEC), Bar= 25µm. **b)** iNOS pozitif glial hücreler, listeriozis, medulla oblongata IHC (AEC), Bar= 25µm. 13
- Şekil 5.** Kaspaz-3 immunreaksiyonu. **1.** Mikroapse bölgesinde yangısal hücrelerde immunopozitif reaksiyon (oklar), listeria, pons, IHC (DAB), Bar= 20µm. **a)** Şekil 5-1'in büyütülmüşü, Bar= 50µm. **2.** Perivasküler hücre infiltrasyonunda ve damar endotel hücrelerinde immunopozitif reaksiyon (oklar), medulla oblongata, listeriozis, IHC (DAB), Bar= 20µm. **b)** Şekil 5-2'nin büyütülmüşü, Bar= 50µm. 14
- Şekil 6.** Kaspaz-3'ün immunohistokimyasal boyamasında intravasküler ve perivasküler hücrelerde immunopozitif reaksiyonlar (oklar) ve purkinje hücrelerinde pozitifliği sergileyen immun reaksiyon (ok başları), listeria, beyincik, IHC (DAB), Bar=100µm 14
- Şekil 7.** 8-OHdG immunopozitifliği. **a)** Damar endotel hücrelerinde (oklar) ve perivasküler hücre infiltrasyonunda pozitif reaksiyon (ok başları), listeria, beyincik, IHC (DAB), Bar=20µm, **b)** Dejeneratif nöronlarda immunopozitif reaksiyon (kalın ok) ile damar endotel hücreleri ile perivasküler hücre

infiltrasyonlarında pozitiflik (oklar) ve purkinje hücrelerinde pozitif immunreaksiyon (ok başı), listeria, Beyincik, IHC (DAB), Bar=100 µm. 15

Şekil 8. Marker ve grup uygulamalarının istatistiksel parametrelerine etkisi, 1-Hastalık grubunu, 2- kontrol grubunu tanımlamaktadır. Harfler (a-c), Student's t testinde ortalamalar arasındaki farklılıkları göstermektedir. Sadece küçük harfler interaksiyon, büyük italik harfler marker ortalamalarını ve normal büyük harfler gruplar için oluşan farklılıkları gösterir. Verilerde sıfır (0) değerleri olduğundan tüm değerlere 20 sayısı eklenerek trasformasyon uygulanmıştır.. 15



ÖZET

Koyunlarda Ensefalitik Listeriozis Hastalığında Patolojik Ve İmmunohistokimyasal İncelemeler

Bu tez çalışmasında, koyunlarda sinirsel semptomlarla seyreden *Listeria monocytogenes* (Lm) enfeksiyonunda şekillenen lezyonların patolojik ve immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi amaçlandı. Bu amaçla, arşivde bulunan daha önceden histopatolojik inceleme yönünden listeria enfeksiyonuna ilgili bulguları sergileyen 10 adet santral sinir sistemi dokularında immunohistokimya boyama yöntemi ile *Listeria monocytogenes* etkeninin pozitifliği saptandı. Ayrıca herhangi bir sinirsel semptom sergilemeyen 10 adet koyuna ait santral sinir sistemi dokuları kontrol olarak kullanıldı. Etken yönünden immunopozitif olan beyin, beyincik, pons, medulla oblongata ve talamus bölgelerinde kaspaz-3, glial fibriler asidik protein (GFAP), indüklenbilir nitrik oksit sentetaz (iNOS) ve 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) ekspresyonlarını belirlemek için immunohistokimya yöntemi uygulandı ve kontrollerle karşılaştırıldı. Tüm preparatlar ışık mikroskopunda değerlendirilerek fotoğraflandırıldı. Bu değerlendirmeler sonucunda koyunlarda ensefalitik listeriozisin patogenezinde kaspaz-3, iNOS, 8-OHdG ve GFAP'nin rolü ile patolojik mekanizmaların açıklanmasına ve hastalığın tedavi seçeneklerine bilimsel alt yapı oluşturabileceği, özellikle de 8-OHdG'nin önemli katkı sağlayabileceği düşünüldü.

Anahtar sözcükler: *Listeria monocytogenes*, İmmunohistokimya, GFAP, 8-OHdG, iNOS, Kaspaz-3, Patoloji

ABSTRACT

Pathological And Immunohistochemical Investigations In Encephalitic Listeriosis In Sheep

In this thesis study, it was aimed to evaluate the lesions formed in *Listeria monocytogenes* (*Lm*) infection with neurological symptoms in sheep by pathological and immunohistochemical methods. For this purpose, 10 central nervous system tissues from the archive, which had previously exhibited findings related to listeria infection in terms of histopathological examination, were determined to be positive for the agent *Listeria monocytogenes* by immunohistochemical staining method. In addition, 10 central nervous system tissues from sheep that did not exhibit any neurological symptoms were used as controls. Immunohistochemistry method was applied to determine the expressions of caspase-3, glial fibrillary acidic protein (GFAP), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in the brain, cerebellum, pons, medulla oblongata and thalamus regions that were immunopositive for the agent and compared with controls. All preparations were evaluated under light microscope and photographed. As a result of these evaluations, it was thought that caspase-3, iNOS, 8-OHdG and GFAP, which play a role in the pathogenesis of encephalitic listeriosis in sheep, could contribute significantly to the explanation of the pathological mechanisms of the disease and to the scientific basis of the treatment options of the disease, especially 8-OHdG.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, Immunohistochemistry, GFAP, 8-OHdG, iNOS, Caspase-3, Pathology

1. GİRİŞ

Listeria monocytogenes (Lm), insan, sığır, koyun, keçi, köpek, kedi, at, domuz, Güney Amerika devegiller, çiftlik geyikleri ve kümes hayvanları da dahil olmak üzere çok çeşitli evcil ve yabani memeli ile memeli olmayan türlerde hastalık yapan patojen bir bakteridir. Hastalık, genellikle "listeriosis" olarak adlandırılır ve zoonotik potansiyele sahip olup, dünya çapında yaygın olan bir enfeksiyon olduğu bildirilmiştir.[Gray ML and Killinger A (1), Bagatella S et al. (2)]. Ancak enfeksiyonların insanlar ve geniş getiren hayvanlar dışındaki türlerde sporadik olarak görüldüğü kaydedilmiştir. Lm, yalnızca halk sağlığı ve gıda güvenliği açısından endişe kaynağı olmakla kalmayıp, aynı zamanda çiftlik hayvanları ve yavruları etkilendiğinde ekonomik kayıpların da önemli bir nedeni olduğu kabul edilmektedir. [Bagatella S et al. (2) Doijad SP et al. (3)].

Lm'nin, Gram-pozitif, spor oluşturmayan, fakültatif hücre içi, anaerobik ve özellikle ozmo- ve halotolerant olabilen, %10'a kadar sodyum klorür (NaCl) içeren ortamlarda çoğalabilen, çok yönlü kokobasil bir bakteri olduğu rapor edilmiştir [Bagatella S et al. (2)]. Ayrıca etkenin geniş bir sıcaklık skalasında (1°C - 45°C) ve pH 5–9 aralığında çoğaldığı bildirilmiştir [Falerio ML et al. (4), Czuprynski C et al. (5)]. Bakterinin geniş yaşam aralığı, etkenin çok çeşitli ekolojik habitatlarda yaşamasına olanak sağlarken, çevresel stres faktörlerine karşı bakterinin direncini de artırmaktadır [Bagatella S et al. (2), Vazquez Boland JA et al. (6)].

Lm enfeksiyonunun, evcil hayvanlarda şekillenmesinde en önemli kaynaklardan biri enfekte silajın tüketilmesi sonrasında gıda kökenli olarak meydana gelmektedir. Hastalık, genellikle hayvanların kapalı alanda olduğu kış aylarında ve ilkbahar başlarında ortaya çıkar [Wagner M et al. (7), Maxie MG and Youssef S (8)]. Listeriosis, en yaygın olarak oral enfeksiyon sonucu ortaya çıkmaktadır. Ancak nadiren vücut yüzeylerinde lokal bakteri implantasyonundan (keratokonjonktivitis, dermatitis) veya genital sistemin asendens enfeksiyonundan kaynaklanabilmektedir [Gray ML and Killinger A (1), Bagatella S et al. (2), Vazquez Boland JA et al (6), Poulsen KP and Czuprynski CJ (9), Schlech WF (10)]. Oral enfeksiyonun ardından etken gastrointestinal sistemde (GIS) kolonize olabilir veya sıklıkla gastrointestinal bariyerini geçip invaziv hastalığa neden olmasına rağmen, subklinik taşıyıcılar tarafından etken saçılabilir veya sadece enteritis ile sınırlı kalabilmektedir. İnvaziv listeriosisın ana formları arasında sepsisemi, fet-

maternal/perinatal enfeksiyon ve ayrı olarak ortaya çıkma eğiliminde olan, etkilenen bireylerde veya sürüde nadiren birlikte görülen santral sinir sistemi (SSS) hastalığı şekillenebilmektedir [Bagetella S et al. (2), Low J and Renton C (11), Low J and Donachie W (12)]. Listeria enfeksiyonunun santral sinir sistemi formu en yaygın görülen form olup, meninjitis/meningoensefalitis ile seyretmektedir [Gray ML and Killinger A (1), Wesley IV (13), Bartt R (14), Haligur et al. (15)].

Santral sinir sistemi enfeksiyonu birçok türde rapor edilmiş olmasına rağmen insanlarda ve geviş getirenlerde büyük bir sorun olarak ifade edilmektedir. İnsanlarda, yıllık ortalama 1 ila 11 vaka/milyon kişi gibi düşük görülme sıklığına rağmen listeriosis, insanlarda gıda kaynaklı hastalıklar arasında en yüksek ölüm oranına sahip hastalık olduğu bildirilmiştir [Bagetella S et al. (2), Mead PS et al. (16), European Commission (17)]. Sinirsel bulgularla karakterize listeriozis, türler arasındaki farklılıkları nöro-invaziv pato-mekanizmalara bağlı olarak farklı patolojik formlarla ortaya çıkmaktadır [Gray ML and Killinger A (1), Wesley IV (13), Bartt R (14), Haligur et al. (15)].

2. GENEL BİLGİLER

Ruminantlarda listeria enfeksiyonuna ilgili santral sinir sistemindeki lezyonlar çoğunlukla rombensefalon bölgesinde lokalize olmaktadır. Rombensefalitis patolojisi, özellikle yangısal lezyonların topografyası ve doğası açısından oldukça önemlidir. Listerioziste, lezyonlar özellikle beyin sapında yerleşiktir. Bunun yanı sıra hastalığın karakteristik bulgularından bir olan supuratif/granülomatöz odakların (mikroapse adı verilen) yanı sıra mononükleer perivasküler hücre infiltrasyonundan oluşan bir kombinasyonu kapsamaktadır. Hastalıktan etkilenen hayvanlarda lezyonlar medulla oblongatadan ve ponstan kaudal (servikal omurilik) ve rostral (beyincik, orta beyin, talamus, istisnai olarak hipokampus, bazal çekirdekler ve serebral korteks) bölgelere kadar yayılabilirler [Oevermann A et al. (18), Cone LA et al. (19)]. Lezyonlar özellikle lezyonlar beyin diğer bölgelerine göre pontomedüller (pons) bölgede genellikle de daha fazla yoğunlukta ve kroniklik ile birlikte nöraksis boyunca sürekli görülmektedir [Haligur M et al. (15), Charlton KM and Garcia MM (20), Oevermann A et al (21)]. Mikroapseler, hem gri hem de beyaz maddede meydana gelen küçük, sınırlı lezyonlardan büyük birleşen alanlara kadar değişebilir. Sıklıkla, aksonal liflerin veya tek kraniyal sinir çekirdeğinin yönünü takip ediyor gibi göründükleri ilginç bir model gösterirler ve nadiren hem kraniyal siniri hem de onun liflerini etkileyen lezyonlar görülebilir. Beyin sapındaki mikroapseler sıklıkla trigeminal spinal, fasiyal, hipoglossal ve okülomotor çekirdekleri ve bunların yollarını etkiler [Haligur M et al. (15), Oevermann A et al (21), Henke D et al. (22)]. Mikroapselerin bileşimi kronikliğe göre değişir: erken lezyonlar başlangıçta küçük nötrofil ve mikroglia kümeleri halinde ortaya çıkar, neredeyse saf nötrofilik lökosit infiltrasyonundan oluşan mikroapseler görülür. Daha sonra, nötrofil lökosit ve makrofaj karışımı, son olarak da makrofajların baskın olduğu ve zaman zaman çok çekirdekli dev hücrelerin görülebildiği kronik granülomatöz lezyonlar meydana gelir [Haligur M et al (15), Choudhury N et al. (23), Charlier C et al. (24)]. Bunların dışında hastalığın histopatolojik bulgularında belirgin bir perivasküler hücre infiltrasyonu yer alır. Mikroskobik bulgular, çoğunlukla mononükleer hücreler, gliosis, fokal ödem ve damar duvarında fibrinoid nekroz, proteinli sıvının perivasküler eksudasyonu ve kanamalarla karakterize vasküler hasardan oluşur. Nöronal nekroz, sıklıkla mikroapselerin çevresinde de görülür [Oevermann A et al. (18)]. Ayrıca, özellikle trigeminal sinir başta olmak üzere

kraniyal sinirlerde ganglionöritise ilgili lezyonlar görülür [Charlton KM and Garcia MM (20), Barlow R and McGorum B (25), Aguilar-Bultet L et al. (26)].

Hastalığın kesin tanısı için etken izolasyon ve identifikasyonun yapılması ve etkenin ortaya konulması oldukça önemlidir. Ancak, *Lm* izolasyonu için uzun süreye ihtiyaç duyulması, yöntemin maliyetinin yüksek olması ve sonuçta da başarısız olma ihtimalinin yüksek olmasından dolayı oldukça zordur [Weinstock D et al. (27)]. Günümüzde hastalık etkeninin teşhis edilmesinde daha hassas olan antikör-antijen bağlanmasına dayanan immunohistokimyasal yöntemin oldukça başarılı olduğu vurgulanmaktadır. Hastalığın patogenezinin açıklığa kavuşturulmasında immunohistokimyasal yöntemde çok sayıda biyobelirteç kullanılmaktadır [Haligür M et al. (15), Oevermann A et al. (18), Ilhan F et al. (28), Karayigit MO and Dincel GC (29)].

Glial fibriler asidik protein, astrositlerde eksprese edilen bir tip-III intermediate filament [Bongcam-Rudloff E et al. (30), Isaacs A et al. (31)], olup astrositlere destek ve dayanıklılık sağlar [Jacque CM et al. (32)]. Bu yapısal protein hücre hareketi için de gereklidir. GFAP konsantrasyonu, SSS'deki bölgeler arasında farklılık göstermektedir. GFAP konsantrasyonun en yüksek seviyeleri medulla oblongata, servikal omurilik ve hipokampusta gözlenmektedir [Jacque CM et al. (32), Sjölin K et al. (33)]. GFAP, hücreler arası iletişimi sağlar ve kan-beyin bariyerini düzenler [Jacque CM et al (32), Tardy M et al. (34)]. Kan-beyin bariyeri hasar gördüğünde astrositler hasarlı dokuya GFAP salgılarlar [Abbott NJ et al. (35)]. Bu nedenle kan-beyin bariyerinin durumunu araştırmak için GFAP ekspresyonu kullanılabilir [Lee JD et al. (36), Van Horssen J et al. (37)]. Beyin hasarına yanıt olarak GFAP ekspresyonu ve reaktif gliosis önemli ölçüde artar [Vijayan VK et al. (38)]. Meningitis veya ensefalomiyelitise neden olan patojenler, özellikle kan-beyin bariyerinin bozulmasından sonra merkezi sinir sistemini istila ederler. Beyinde lökosit varlığı kan-beyin bariyerinin bozulduğunun güçlü bir kanıtı olarak kabul edilmektedir [Lee JD et al. (36), Nikolskaia OV et al. (39)]. Koyunlarda ensefalitik listerioziste enfeksiyonunda kan beyin bariyerini bozabildiği astrositlerde artan GFAP ekspresyonunun varlığı ile rapor edilmektedir [Haligür M et al. (15)]. Knockout farelerde yapılan bir çalışmada GFAP'nin, anormal miyelinasyon, beyaz madde yapısında bozulma ve kan-beyin bariyerinde fonksiyonel/yapısal bozulma dahil olmak üzere birçok dejeneratif süreçte rol oynadığı bildirilmektedir. Bu nedenle GFAP'nin SSS'indeki birçok kritik rol için gerekli olduğu ifade edilmektedir [Liedtke W et al. (40)]. Ayrıca, GFAP'ın

SSS'indeki hasar sonrası onarımda da önemli olduğu bildirilmiş [Paetau A et al. (41), Tuccari G et al. (42)].

Kaspaz-3 proteini, sistein-aspartik asit proteaz ailesinin bir üyesidir. Kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 ile etkileşime giren bir kaspaz proteindir. Kaspaz-3 geni tarafından kodlanır [Alnemri ES et al. (43)]. Kaspazların ardışık aktivasyonu, hücre apoptozunun şekillenmesinde merkezi bir rol oynar. Kaspazlar, aktif enzimi oluşturmak üzere dimerize olan büyük ve küçük iki alt birimi üretmek için korunmuş aspartik kalıntılarda proteolitik işleme tabi tutulan aktif olmayan proenzimler (zimogen form) olarak bulunmaktadır. Bu protein kaspaz-6 ve -7'yi böler ve aktive eder. Kaspaz-3'ün kendisi -8, -9 ve -10 numaralı kaspazlar tarafından işlenir ve etkinleştirilir [Gervais FG et al. (44), Harrington HA et al. (45)]. Kaspaz-3, apoptotik hücrede hem ekstrinsik/dışsal (ölüm ligandı) hem de intrinsik/içsel (mitokondriyal) yollarla aktive edilir [Salvesen GS (46), Thorburn A (47), Ghavami S et al. (48)]. Kaspaz-3'ün zimojen özelliği önemlidir/gereklidir, çünkü kaspaz aktivitesi düzenlenmediği takdirde hücrelerin ayrımı gözetilmeden ölümüne yol açar [Boatright KM and Salvesen GS (49)]. Kaspazlar arasında bir sinyalleme olayının başlaması, başlatıcı kaspazları aktive edebilen granzim B'nin, öldürücü T hücreleri tarafından apoptoz için hedeflenen hücrelere dahil edilmesini sağlamaktadır [Gallaher BW et al. (50), Katunuma N et al (51)]. Bu ekstrinsik yolla (ölüm ligandı yolu) aktivasyon daha sonra kaspaz-3'ün baskın bir rol oynadığı apoptotik yolun ayırt edici kaspaz kademesi karakteristiğini tetikler [Salvesen GS (46), Thorburn A (47), Ghavami S et al. (48), Perry DK et al. (52)]. İntrinsik yolla (mitokondrial yol) aktivasyonda, mitokondriden gelen sitokrom c, prokaspaz-3'ü işlemek için kaspaz-9, apoptoz aktive edici faktör 1 (Apaf-1) ve adenosin trifosfat (ATP) ile kombinasyon halinde çalışır. Bu moleküller in vitro kaspaz-3'ü aktive etmek için yeterlidir, ancak diğer düzenleyici proteinler in vivo olarak gereklidir [Ghavami S et al. (48), Li P et al. (53), Riedl SJ and Salvesen GS (54)]. Listeriolysin O (LLO), listeriosis'e neden olmaktan sorumlu olan patojen *Lm* bakterisi tarafından üretilen bir hemolizindir. Toksin, *Lm*'in virulansı için çok önemli olduğundan bir virulans faktörü olarak düşünülebilir [Cossart P (55), Petrisic N et al. (56)]. Aktive edilmiş T hücrelerinde LLO aracılı apoptoz indüksiyonunun mekanizması iki süreci kapsamaktadır. Bunlardan, biri kaspaz-3 ve kaspaz-6 aktivasyonuna kadar olan süreçtir [Ghavami S et al. (48), Carrero JA et al. (57), Wiktorczyk-Kapischke N et al. (58)]. Kaspaz aktivasyonu, granzimlerin ifadesine

bağlıdır. Diğer mekanizma ise, LLO'ya bağımlıdır, ancak kaspazdan bağımsızdır. Fosfatidilserinin yıkımlanması plazma membran potansiyelinin kaybını indükler [Carrero JA et al. (57), Wiktorczyk-Kapischke N et al. (58)]. Listeriolysin O, konağın bağışıklık sistemini uyarır, pro-inflamatuar mediyatörlerin, sitokinlerin üretimini etkiler ve nükleer faktör kapp B (NF- κ B) yolu ile antikor oluşumunu aktive eder. LLO ayrıca apoptotik yolları indükleyebilir, mitojenle aktive edilen protein kinazlarını (MAP kinazlar) uyarabilir ve yapışma moleküllerinin ekspresyonunu artırabilir [Wiktorczyk-Kapischke N et al. (58), Camejo A et al. (59)].

Reaktif oksijen türleri (ROS), hücre metabolizmasının ekzojen fiziksel veya kimyasal kaynakların etkisinin bir sonucu olarak, canlı hücrelerde her yerde bulunan serbest radikallerin formlarıdır [Pilger A and Rudiger HW (60)]. Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu Deoksiribonükleik asit (DNA) hasarı, hücre DNA onarım mekanizmalarıyla önlenir. Bu savunma kapasiteleri, reaktif oksijen türlerinin üretiminin artması veya azalmasıyla aşıldığında oksidatif stres (OS) gelişir [Halliwell B and Gutteridge JM (61), Xing H et al. (62)]. Oksidatif stres, lipitleri, proteinleri ve nükleik asitleri olumsuz yönde etkiler [Winterbourne CC (63)]. Serbest radikallerin tespiti, yarı ömürlerinin kısa olması nedeniyle karmaşıktır ve bu nedenle tespit daha çok ürünlerine yöneliktir. Bunlar modifiye edilmiş nükleozidlerdir; bunların arasında en önemli olanı, guanin'in timine dönüşümünü indükleyebildiği için biyolojik olarak son derece ilişkili olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozindir [Pilger A and Rudiger HW (60), Halliwell B and Gutteridge JM (61), Xing H et al (62), Halliwell B (64)]. Deneysel olarak *Lm* ile enfekte edilmiş sıgırların beyin dokusunda aşırı serbest radikal oluşumuna bağlı lipit oksidasyonu meydana geldiği ve bu durum aratan OS'nin reaktif oksijen türevlerinden kaynaklandığını bildirilmiştir [Jaguezeski AM et al. (65)]. *Lm* ile enfekte küçük ruminantlarda yapılan bir çalışmada ensefalitik listeriosis enfeksiyonuna bağlı olarak kan-beyin bariyerinin bozulduğu ve ödemin olduğu bildirilmiş, bu değişikliklerin mitokondriyal DNA hasarına bağlı olduğu kaydedilmiştir. Ayrıca, aynı çalışmada, nöronlarda ve glial hücrelerde güçlü mitokondriyal DNA hasarının belirlenmesinde 8-OHdG ekspresyonu önemli bir belirteç olduğu vurgulanmıştır [Karayigit MO and Dincel GC (29)].

Nitrik oksit (NO), çeşitli biyolojik aşamalarda rol oynayan önemli bir biyolojik habercidir [Weller R (66)]. Bakteriler, bitkiler, mantarlar ve hayvan hücreleri de dahil olmak üzere tüm organizma türlerinde bulunan bir biyoüründür [Roszer T (67)]. Endotel

kaynaklı bir gevşetici faktör (EDRF) olan nitrik oksit, çeşitli nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleri tarafından L-arginin, oksijen ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat'tan (NADPH'den) endojen olarak biyosentezlenir [Perez KM and Laughon M (68)]. Nitrik oksit oldukça reaktiftir (birkaç saniyelik ömrü vardır), ancak membranlar arasında serbestçe yayılır. Bu özellik, nitrik oksidi geçici bir parakrin (bitişik hücreler arasında) ve otokrin (tek bir hücre içinde) sinyal molekülü için ideal kılar. Kan damarlarının endoteli, çevredeki düz kaslara gevşeme sinyali vermek için nitrik oksit kullanır, bu da vazodilatasyona ve kan akışının artmasına neden olur [Stryer L (69)]. Makrofajlarda indüklenebilir nitrik oksit sentazı tarafından üretilen nitrik oksit, antimikrobiyal konak savunmasında ve immun gözetimde önemli bir role sahiptir. NO, viruslar, bakteriler, mantarlar ve protozoan ile metazoan parazitler dahil olmak üzere çok çeşitli mikrobiyal patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlara karşı konak direncine veya bu enfeksiyonlardan iyileşmeye katkıda bulunur [MacMicking J et al. (70)]. Öte yandan, iNOS eksprese eden hücreler tarafından üretilen NO, immünosupresyondan apoptoza ve doku ölümüne kadar uzanan çeşitli hastalık semptomlarına katkıda bulunur [Schleifer KW and Mansfield JM (71), Tamir S et al. (72)]. Yapılan çalışmalarda listerik ensefalitis olgularında etkenin gevşetirenlerin makrofajlarında iNOS'un uyarılması için güçlü bir uyarıcı olduğu belirtilmiştir [Pfister H et al. (73), Jungi TW et al. (74)]. Üç enzim nitrik oksidi sentezlenmektedir. Bunlar nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS), iNOS ve endotelial nitrik oksit sentazdır (eNOS) [Moncada et al. (75), Picon PP et al. (76)]. Nöropatolojik tablonun şekillenmesinde SSS'deki aşırı NO üretiminin sorumlu olabileceği ifade edilmiştir [Dawson VL et al. (77), Calabrese V et al. (78)]. Ayrıca, NO'nun mitokondriyal membran potansiyelinin kaybına neden olduğu ve böylece apoptozu başlattığı da bilinmektedir [Bonfoco E et al. (79), Jungi TW et al. (80)]. Bazı araştırmacılar, ensefalitik listeriozisin patogeneğinde çeşitli NOS tiplerinin güçlü ekspresyonunun olabileceğini ileri sürmüşlerdir [Karayigit MO and Dincel GC (29), Jungi TW et al. (80)]. Bu tez çalışmasında, *Listeria monocytogenes* enfeksiyonunda hastalığın patogeneğinde ve lezyonların oluşmasında etkili molekülerin ekspresyonları araştırılarak, immunohistokimyasal yöntem ile etken, GFAP, 8-OHdG, iNOS ve Kaspaz-3 ekspresyonun hastalığındaki rollerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Materyal ve Histopatoloji

Çalışmanın materyali, arşivden temin edilen 10 adet *Listeria monocytogenes* ile doğal enfekte koyuna ait santral sinir sistemi dokuları (beyin, beyincik, medulla oblongata, pons, talamus vs.) ile kontrol amaçlı olarak santral sinir sisteminde herhangi bir hastalık bulgusu sergilmeyen 10 adet koyuna ait dokulardan oluşturuldu. Dokular %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Dokulardan trim yapılarak, doku takip cihazında takip edildi ve parafinde bloklandı. Parafin bloklardan 5µm'lik kesitler alınarak, Hematoksilen-Eozin (HxE) ile boyandı. Listeriozis teşhisi konulan dokulara da immunohistokimyasal (IHC) boyama yöntemi için doku takip prosedürü prosedürü uygulandı.

3.2. İmmunohistokimya yöntemi

İmmunohistokimyasal boyama için polilizinli lamlara 5µm kalınlığında alınan kesitler alındı, 59 C°'lik etüvde deparafinize edildi. Ardından kesitler ksilen içerisinde 30 dakika bekletildikten sonra deparafinize işlemi tamamlandı. Kesitler, seri alkollerden geçirildikten sonra distile su içerisinde alkollerini giderilene kadar yıkandı. İlk önce 20 dakika 600 devirde mikrodalga fırında antijen-retrivel (antijeni açığa çıkarma) yapıldı. Ardından kesitler PBS (fosfat buffer solüsyonu) ile yıkandıktan sonra dokudaki peroksidaz aktivitesini maskelemek için 15 dakika %5'lik hidrojen peroksitle muamele edildi. Kesitler PBS ile yıkandıktan sonra non-spesifik bağlanmaları engellemek için protein blokingte 10 dakika bekletildi. Sonra fazla bloking dökülüp yıkama yapılmadan primer antikor uygulandı. Kesitler, primer antikorda [(*L. monocytogenes* antibody, 1/250 diluton, Novus NB100-65667); (iNOS (1/250 dilution, Santa-Cruz, sc-7271); GFAP (1/500 dilution, abcam, ab7779); (8-OHdG, 1/250 dilution, Santa Cruz Biotechnology, sc-393871); (Caspase-3, 1/100 dilution, Santa Cruz Biotechnology, sc-7272)] oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübasyonda bırakıldı. Süre sonunda kesitler yıkanıp sekonder antikorda yarım saat bekletildi. Daha sonra kesitler yine yıkanıp streptavidin peroksidaz enziminde yarım saat bekledikten sonra yıkamaya alındı. Protein bloke edici serum ile inkubasyon aşaması hariç tüm işlemlerden sonra kesitler 2 kez 5'er dakika süreyle PBS ile yıkandı. Son olarak kesitlere 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) ve 3,3'

Diaminobenzidine (DAB) kromojenleri uygulanarak ışık mikroskobu altında kontrollü olarak 10 dakika süreyle boyandı. Gill's hematoxilen ile karşıt boyamaları yapıldı. AEC kromojeni için su bazlı yapıştırıcı kullanıldı. DAB kromaojeni uygulanan kesitler ise dereceli alkollerden ve ksilollerden geçirilerek entallen ile kapatıldı. Tüm kesitler kapatıldıktan sonra Carl Zeiss Primo Star ışık mikroskobunda incelenerek, fotoğraflandırıldı.

3.3. İstatiksel Analiz

Veriler JMP Pro16 istatistik programı kullanılarak hastalıklı vakalardan oluşan grup ile kontrol grubu kıyaslanarak değerlendirildi. Bu programda veriler Student's t-test ile analiz edildi. Sonuçlar Gruplar, markerler ve grup-marker açısından değerlendirildi. Sonuçlar ortalama (medyan) $\pm$ standart sapma (SD) formatında sunuldu. $P < 0,0001$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

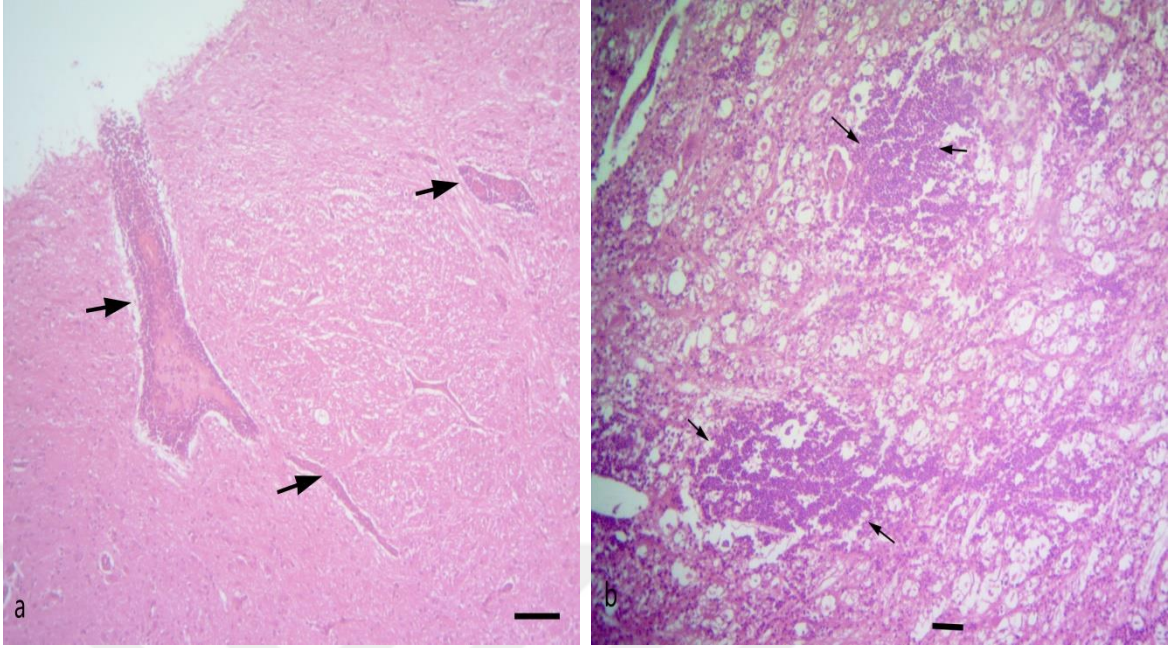
4.1. Makroskopik Bulgular

Makroskopik olarak incelenen 10 adet koyuna ait ensefalitik listeriozis bulguları sergileyen vakaların beyinleri açıldığında girusların kalınlaştığı, beyin dokusunun taşkın, ödemli ve meningeal damarların hiperemik olduğu fark edildi. Bu olguların 7 tanesinde meninkslerde kalınlaşma, opaklaşma ve 7 olgunun 3 tanesinde de çok hafif sarımsı, yeşilimsi irin dikkati çekti. Bu bulguların özellikle beyincik, pons, medulla oblongata ve talamusta lokalize olduğu görüldü. Diğer geri kalan 3 olguda ise beyinde herhangi bir bulguya rastlanmadı.

4.2. Mikroskopik Bulgular

Listeria enfeksiyonuna ilgili bulguları sergileyen olgularda incelenen SSS dokularında meningeal damarlarda hiperemi, Virchow-Robin boşluklarında ödem tablosu dikkati çekti. SSS'nin özellikle rombensefalon bölgesine ait pons, medulla oblongata, talamus, beyincik ile meninksler ve kan damarlarının çevresinde çoğunluğu nötrofil lökosit, lenfosit ve mikrogliyalarda oluşan aralarında plazma hücrelerinin de bulunduğu mononükleer hücre infiltrasyonu saptandı. Bu olgularda şekillenen bulgular ensefalitis ve meningoensefalitis tablosunu sergilemekteydi. Ayrıca aynı bölgelerde nöronal dejenerasyon ve nekrozlar dikkati çekti.

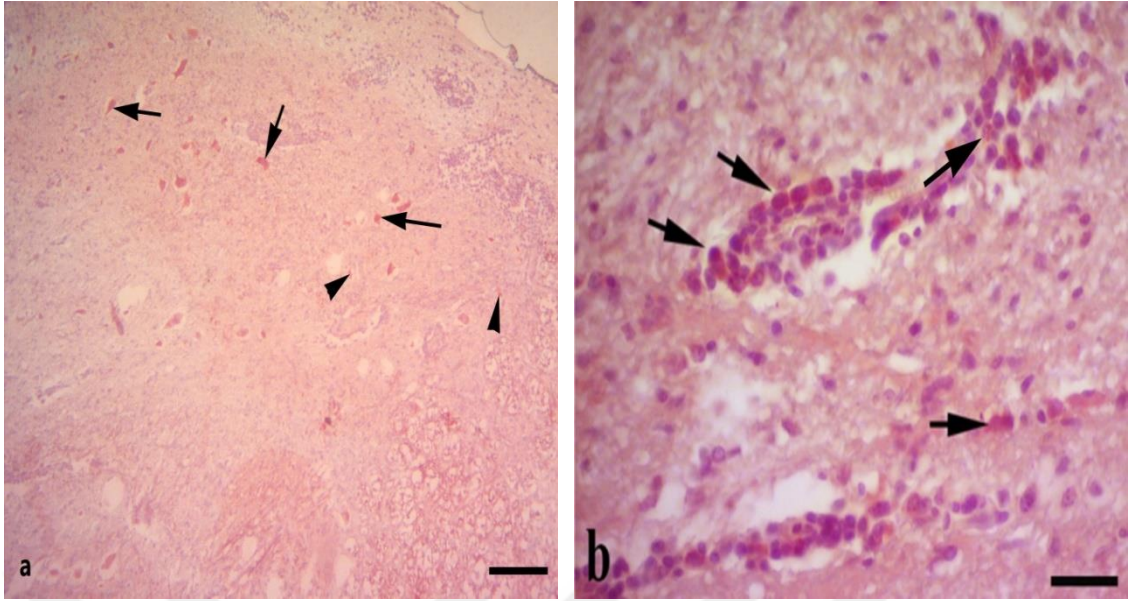
Hastalığın tanıtıcı bulgusu olan nötrofil lökosit, lenfosit ve plazma hücre infiltrasyonlarından oluşan mikroapse formasyonuna sıklıkla meninksler, beyincik, medulla oblongata ve ponsta, daha az olarak talamus dokusunda rastlandı (Şekil-1).



Şekil 1. Hematoksilen Eozin ile histopatolojik boyama. **a)** Perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonu (oklar), listeriosis, medulla oblongata, HxE, Bar=100µm. **b)** Etkilenen bölgede mikroapse odakları (oklar), listeriosis, medulla oblongata, HxE, Bar= 25µm.

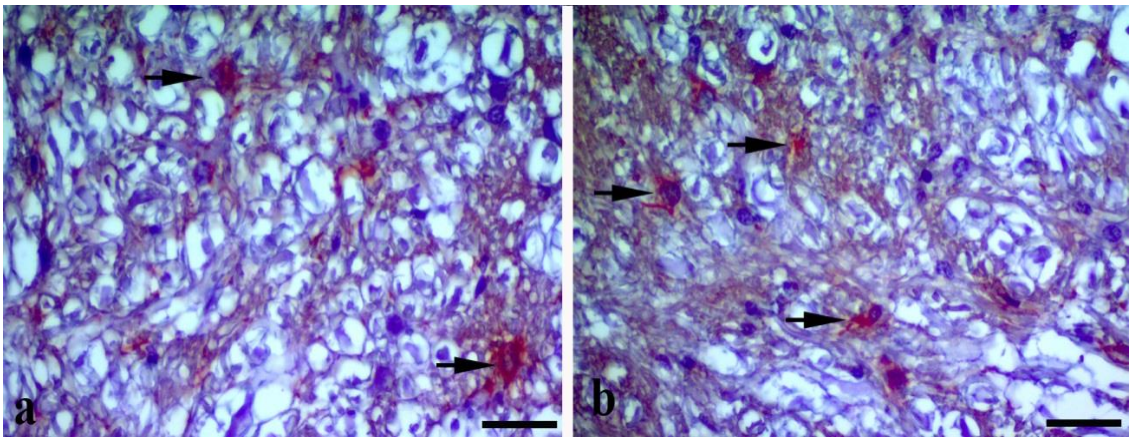
4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular

İmmunohistokimyasal incelemelerde, pons, medulla oblongata, talamus ve beyincikteki nöronlarda ile glial hücrelerde listeria etkeninin varlığını gösteren immunopozitif reaksiyonlar saptandı. Ayrıca aynı bölgelerde ve perivasküler hücre infiltrasyonları ile mikroapseleri oluşturan yangısal hücrelerin sitoplazmalarında etkenin varlığını ortaya koyan immunopozitif boyamalar dikkati çekti (Şekil-2).



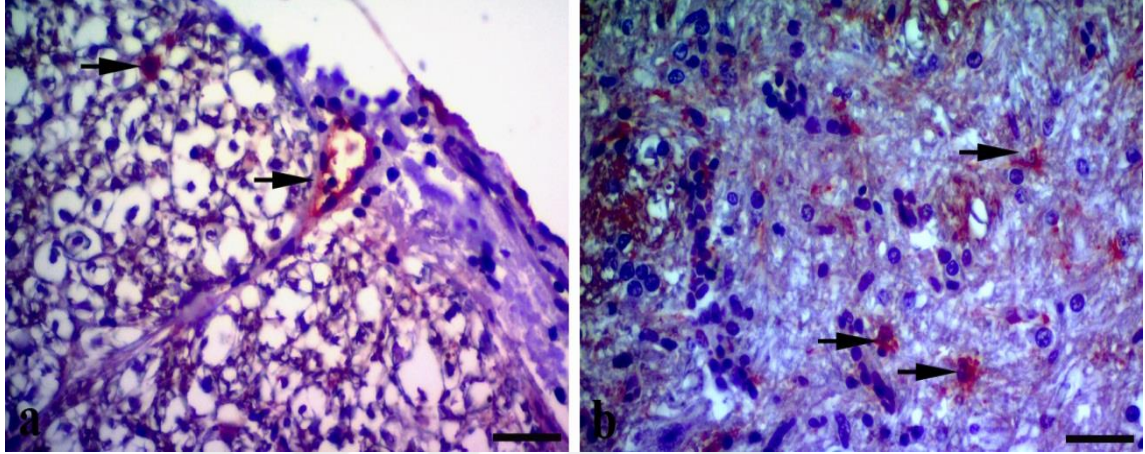
Şekil 2. Listeria antikorı ile immunohistokimyasal boyama. **a)** Listeria pozitif nöronlar (oklar) ve glial hücreler (ok başları), listeriozis, medulla oblongata IHC (AEC), Bar=100µm. **b)** Listeria pozitif perivasküler yangısal hücreler (oklar), listeriozis, medulla oblongata IHC (AEC), Bar= 25µm.

Listeria etkeni yönünden immunopozitiflik gösteren olgular ile kontrol grubu dokularında görülen GFAP'nin pozitifliği kıyaslandığında, enfekte olgularda astrositlerde daha yoğun immunopozitif reaksiyonlar dikkati çekti. Bu pozitifliğin özellikle enfekte koyunların beyincik, pons ve medulla oblongata da yoğun olduğu saptandı (Şekil-3).



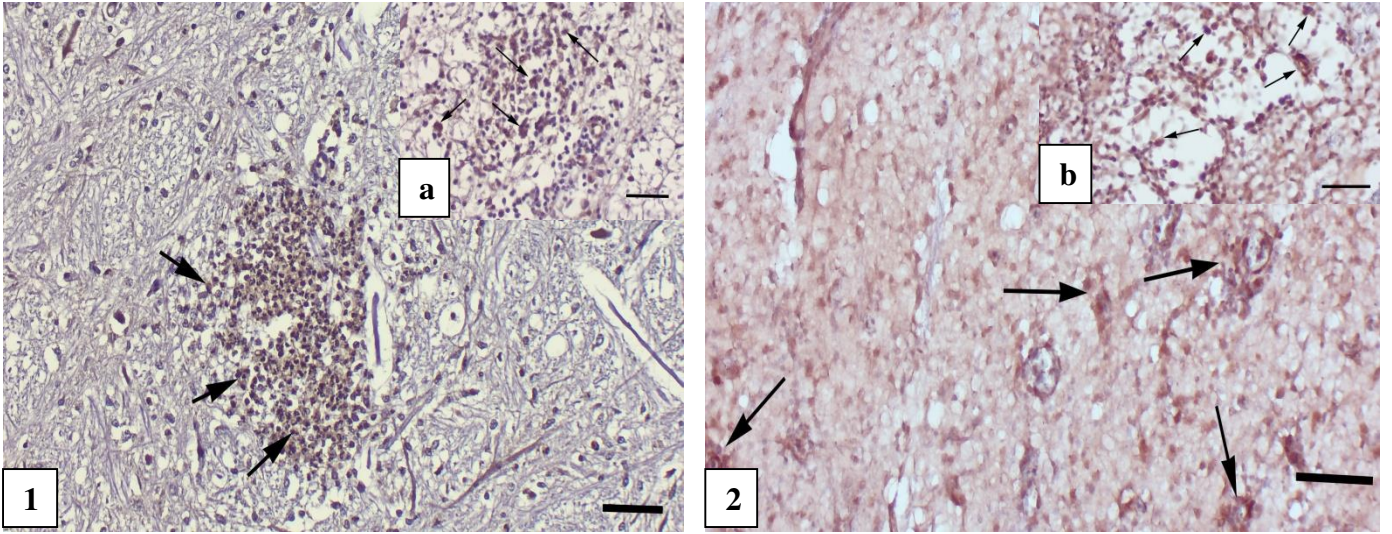
Şekil 3. GFAP immunohistokimyasal boyaması. **a)** GFAP pozitif astrositler (oklar), kontrol, medulla oblongata, listeriozis IHC (AEC), Bar=25µm. **b)** GFAP pozitif astrositler, (oklar), listeriozis, medulla oblongata, IHC (AEC), Bar=25µm.

İndüklenabilir nitrik oksit için yapılan immunohistokimyasal incelemede, pozitif immunreaksiyona medulla oblongata ve beyincikte şiddetli, pons ve talamusta ise orta şiddete rastlandı. Bu bölgelerdeki astrositler ile damar endotel hücrelerinde immunopozitif reaksiyonlar gözlemlendi (Şekil-4).

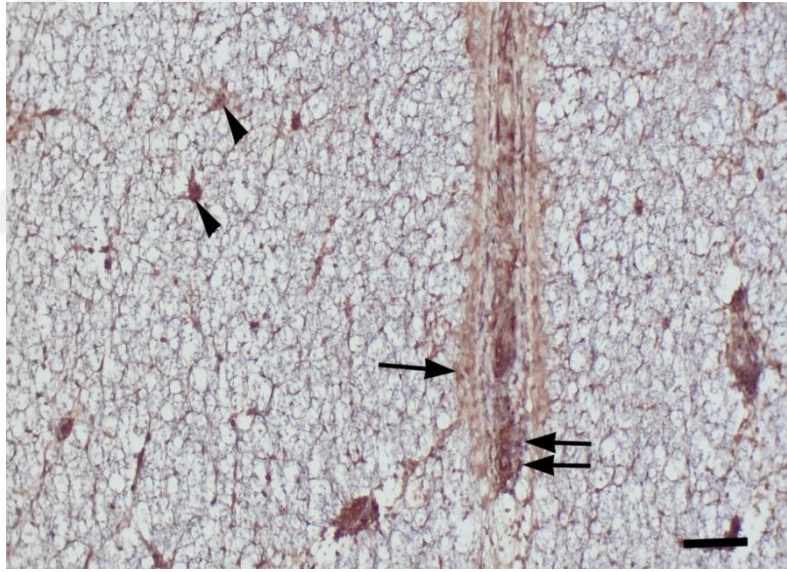


Şekil 4. iNOS immunohistokimyasal boyaması. a) iNOS pozitif glial hücreler ile damar endotel hücreleri (oklar), kontrol, medulla oblongata IHC (AEC), Bar= 25µm. b) iNOS pozitif glial hücreler, listeriozis, medulla oblongata IHC (AEC), Bar= 25µm.

İmmunopozitif kaspaz-3 reaksiyonuna, rombensefalon bölgesinde rastlandı. *Listeria monocytogenes* enfeksiyonuna ilgili olarak patolojik bulguların gözlemlendiği, medulla oblongata, beyincik, pons ve talamusta kaspaz-3 pozitifliği görüldü. Kaspaz-3 immunopozitifliği perivasküler hücre infiltrasyonu olan bölgelerde, mikroapse odaklarının olduğu yerlerde, nöronlarda, purkinje hücrelerinde ve damar endotel hücrelerinde saptandı. (Şekil-5, 6).

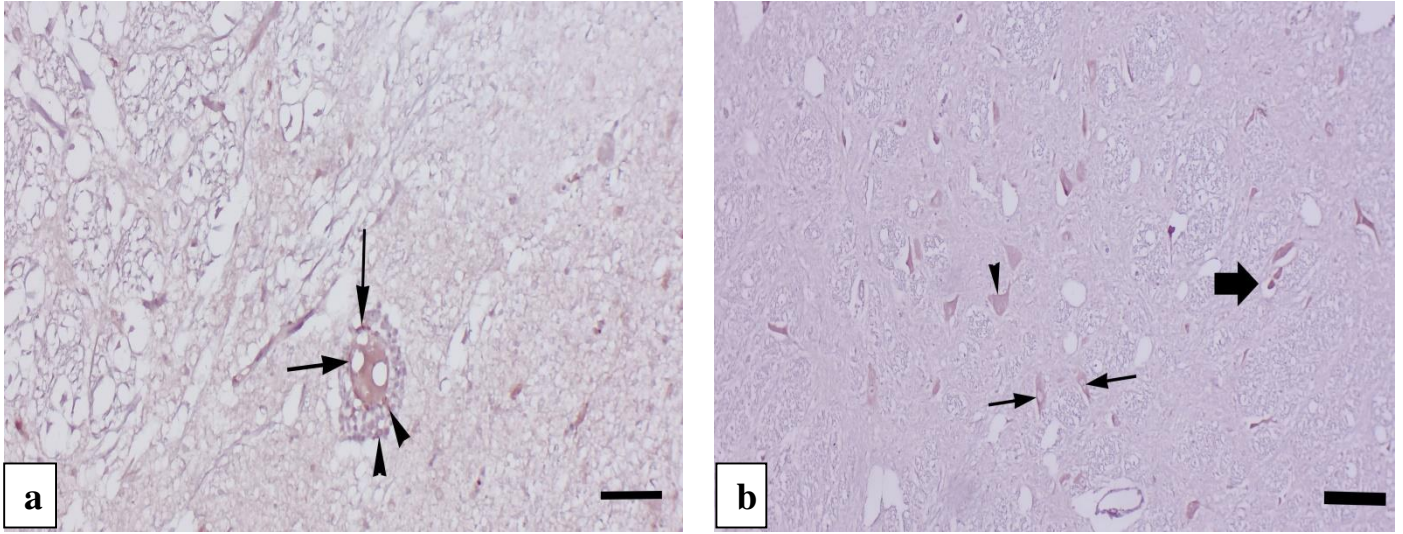


Şekil 5. Kaspaz-3 immunraksiyonu. **1.** Mikroapse bölgesinde yangısal hücrelerde immunopozitif reaksiyon (oklar), listeria, pons, IHC (DAB), Bar= 20µm. **a)** Şekil 5-1'in büyütülmüşü, Bar= 50µm. **2.** Perivasküler hücre infiltrasyonunda ve damar endotel hücrelerinde immunopozitif reaksiyon (oklar), medulla oblongata, listeriozis, IHC (DAB), Bar= 20µm. **b)** Şekil 5-2'nin büyütülmüşü, Bar= 50µm.



Şekil 6. Kaspaz-3'ün immunohistokimyasal boyamasında intravasküler ve perivasküler hücrelerde immunopozitif reaksiyonlar (oklar) ve purkinje hücrelerinde pozitifliği sergileyen immun reaksiyon (ok başları), listeria, beyincik, IHC (DAB), Bar=100µm

8-OHdG için yapılan immunohistokimyasal boyamalarda, *Listeria monocytogenes* ile doğal enfekte koyun santral sinir sisteminde beyincik, medulla oblongata, pons ve talamus ile meninkslerin ekilendiği görüldü. Bu bölgelerde 8-OHdG immunopozitifliği damar endotel hücrelerinde, perivasküler hücre infiltrasyonlarında, dejeneratif nöronlarda ve purkinje hücrelerinde görüldü (Şekil-7).



Şekil 7. 8-OHdG immunopozitifliği. **a)** Damar endotel hücrelerinde (oklar) ve perivasküler hücre infiltrasyonunda pozitif reaksiyon (ok başları), listeria, beyincik, IHC (DAB), Bar=20μm, **b)** Dejeneratif nöronlarda immunopozitif reaksiyon (kalın ok) ile damar endotel hücreleri ile perivasküler hücre infiltrasyonlarında pozitiflik (oklar) ve purkinje hücrelerinde pozitif immunreaksiyon (ok başı), listeria, Beyincik, IHC (DAB), Bar=100 μm.

4.4. İstatiksel bulgular

Verileri incelendiğinde her beş parametre (Astrosit, Yangı hücresi, Purkinje hücresi, Dejenere Nöron ve damar endotel hücresi) için hem interaksiyon, hem grup, hem de marker uygulamaları sonucu oluşan farklılıklar istatistiksel anlamda $p<0,0001$ düzeyinde önemli bulunmuştur. İstatiksel veriler şekil-8’de özetlenmiştir.

	Marker	Gruplar	Astrosit	Yangı hücresi	Purkinje hücresi	Dejenere Nöron	Damar endotel hücresi
Grup*marker	GFAP	1	26,10 ±2,81 a	20,00 ±0,00 c	22,20 ±0,63 a	20,00 ±0,00 d	20,00 ±0,00 c
		2	21,80 ±0,63 b	20,00 ±0,00 c	20,00 ±0,00 c	20,00 ±0,00 d	20,00 ±0,00 c
	iNOS	1	20,00 ±0,00 c	21,50 ±0,53 b	20,00 ±0,00 c	21,40 ±0,52 c	21,90 ±1,10 a
		2	20,00 ±0,00 c	20,00 ±0,00 c	20,00 ±0,00 c	20,00 ±0,00 d	20,00 ±0,00 c
	Kaspas-3	1	20,00 ±0,00 c	38,40 ±3,03 a	20,00 ±0,00 c	23,00 ±0,94 b	20,00 ±0,00 c
		2	20,00 ±0,00 c	20,00 ±0,00 c	20,00 ±0,00 c	20,00 ±0,00 d	20,00 ±0,00 c
	8-OHdG	1	21,80 ±0,63 b	21,60 ±0,70 b	21,90 ±0,57 b	24,80 ±1,75 a	21,10 ±0,74 b
		2	20,00 ±0,00 c	20,00 ±0,00 c	20,00 ±0,00 c	20,00 ±0,00 d	20,00 ±0,00 c
Marker ortalaması	GFAP		23,95 ±2,96 A	20,00 ±0,00 B	21,10 ±1,21 A	20,00 ±0,00 C	20,00 ±0,00 C
	iNOS		20,00 ±0,00 C	20,75 ±0,85 B	20,00 ±0,00 B	20,70 ±0,80 C	20,95 ±1,23 A
	Kaspas-3		20,00 ±0,00 C	29,20 ±9,67 A	20,00 ±0,00 B	21,50 ±1,67 B	20,00 ±0,00 C
	8-OHdG		20,90 ±1,02 B	20,80 ±0,95 B	20,95 ±1,05 A	22,40 ±2,74 A	20,55 ±0,76 B
Grup ortalaması	1		21,98 ±2,88 A	25,38 ±7,79 A	21,03 ±1,12 A	22,30 ±2,07 A	20,75 ±1,03 A
	2		20,45 ±0,85 B	20,00 ±0,00 B	20,00 ±0,00 B	20,00 ±0,00 B	20,00 ±0,00 B
P önem derecesi	Grup*marker		<0,0001****	<0,0001****	<0,0001****	<0,0001****	<0,0001****
	Grup		<0,0001****	<0,0001****	<0,0001****	<0,0001****	<0,0001****
	Marker		<0,0001****	<0,0001****	<0,0001****	<0,0001****	<0,0001****

Şekil 8. Marker ve grup uygulamalarının istatistiksel parametrelerine etkisi, 1-Hastalık grubunu, 2- kontrol grubunu tanımlamaktadır. Harfler (a-c), Student’s t testinde ortalamalar arasındaki farklılıkları göstermektedir. Sadece küçük harfler interaksiyon, büyük italik harfler marker ortalamalarını ve normal büyük harfler gruplar için oluşan farklılıkları gösterir. Verilerde sıfır (0) değerleri olduğundan tüm değerlere 20 sayısı eklenerek trasformasyon uygulanmıştır

5. TARTIŞMA

Listeria monocytogenes enfeksiyonuna küçük ruminantların sığırlara oranla daha duyarlı olduğu, hastalığın bir sürüde tek veya çoklu vakalar olarak ortaya çıktığı ve belirli bir cinsiyet, ırk veya yaşa bağlı yatkınlığının olmadığı ifade edilmiştir [(Gray ML and Killinger A (1), Low J and Donachie W (12), Barlow R and McGorum R (25), Green L and Morgan K (81), Morin DE (82), Wilesmith J and Gitter M (83)]. Bazı çalışmalarda etkenin 2 ile 6 hafta arasında süren uzun bir kuluçka dönemine sahip olduğu belirtilmiştir. Nörolojik belirtilerin genellikle akut olarak ortaya çıktığı ve hızla ilerlediği, ateşin ise enfeksiyonun erken evrelerinde görülebildiği, ancak sürekli olmadığı kaydedilmiştir [(Gray ML and Killinger A (1), Low J and Renton (11), Low J and Donachie M (12), Akiyama Y et al (84), Brugère-Picoux J (85)]. Tipik olarak, gevişgetiren hayvanlarda rombensefalitisin belirtileri tek taraflı veya daha az sıklıkla çift taraflı beyin sapı ve kranial sinirlerin zedelenmesine bağlı olarak ortaya çıktığı bildirilmiştir [Low J and Donachie W (12), Brugère-Picoux J (85), Braun U et al. (86)]. Etkilenen hayvanlarda tek taraflı yüz ve dil felcinin yaygın olduğu, kulak, göz kapağı, dudak ve ağızda ipsilateral sarkma ile hipersalivasyon ve anoreksi görüldüğü rapor edilmiştir. Okülomotor, yüz ve trigeminal sinirlerin etkilenmesine bağlı olarak refleks kaybı, şaşılık ve nadiren de körlüğe yol açabildiği tanımlanmıştır. Küçük ruminantlarda klinik belirtiler arasında ataksi ve dairesel hareketler kaydedilmiştir [Gray ML and Killinger A (1), Wilesmith J and Gitter M (83), Brugère-Picoux J (85)]. Tez çalışmasında kullanılan dokular arşivden temin edildiğinden dolayı hastalığın klinik bulgularına ilgili veri elde edilememiştir.

Listeria monocytogenes etkeninin oluşturduğu nörolisteriosis farklı patolojik formlarda ortaya çıktığı ve bu durumun türler arasında farklı nöroinvaziv patomekanizmaların varlığını gösterdiği bildirilmiştir. İnsanlarda ve monogastrik hayvanlarda 3 formun olduğu, bunlardan meningitis/meningoensefalitisin en sık görülen form olduğu kaydedilmiştir. Beyin apsesi ve beyin sapı ensefalitisinin (rombensefalitis) ise daha az sıklıkla görüldüğü rapor edilmiştir. Ruminantlarda ise rombensefalitisin en yaygın görülen form olduğu tanımlanmıştır [Gray ML and Killinger A (1), Bagatella S et al. (2), Wesley IV (13), Bartt R (14), Haligur M et al. (15), Oevermann A et al. (18)]. Bu tez çalışmasında da *Listeria monocytogenes* enfeksiyonuna bağlı oluşan histopatolojik bulguların sıklıkla rombensefalon bölgesinin özellikle de

medulla oblongata, beyincik, pons ve talamusta lokalize olduğu saptandı. Bu bulgular ile literatür bilgilerinin uyumlu olduğu görüldü.

Hücre kültüründe yapılan bir çalışmada *Lm* etkenlerin mikrogliyalarda ve ikinci olarak da oligodendrositlerde yoğun olarak saptandığı belirtilmiştir [Dramsi S et al. (87)]. *Lm* ile doğal enfekte koyunların santral sinir sisteminde yapılan immunohistokimyasal çalışmalarda etkenin medulla oblongata, pons ve talamustaki perivasküler hücre infiltrasyonu olan bölgelerde, nekrotik alanlarda ve mikroapselerin bulunduğu bölgelerdeki lenfositlerde, mikrogliyalarda ve nötrofil lökositlerde belirlendiği rapor edilmiştir [(Haligur M et al. (15), Oevermann A. et al. (18), Ilhan F et al. (28)]. Bu tez çalışmasında da özellikle başta medulla oblongata ve beyincikte yoğun, pons ve talamusta ise az yoğun immunopozitiflik saptandı. İmmunopozitif reaksiyonlar lenfosit, nötrofil lökosit ve mikrogliyalarda görüldü.

Listeria monocytogenes ile doğal enfekte SSS dokularında GFAP ile ilgili yapılan bir çalışmada özellikle perivasküler astrositler ile mikroglia, nötrofil lökosit, dejeneratif ve nekrotik nöronlar güçlü immun reaksiyonların gözlemlendiği bildirilmiştir. Ayrıca, perivasküler ile meningeal yangısal hücrelerin olduğu bölgelerde GFAP pozitif reaksiyonun varlığı kaydedilmiştir. Bunlara ilaveten serebellumdaki purkinje hücrelerinin de pozitiflik sergilediği rapor edilmiştir [(Haligur M et al. (15), Oevermann A. et al. (18), Weinstock D. et al. (27), Ilhan F.ve ark. (28)]. Bu tez çalışmasında elde edilen bulguların literatür ile uyumlu olduğu saptandı. Astrositlerin immunopozitifliği *Listeria monocytogenes* enfeksiyonu sonucunda nöronların beslenememesi sonrasında dejenerasyon ve nekroza uğradığı, bu durumun da etkenin çoğalması ve yayılmasına ortam hazırlayabileceği şeklinde yorumlandı.

Apoptozun, konakçıya fayda sağlamak için enfekte olmuş ve tehlike altındaki hücreleri ortadan kaldırabildiği bildirilmiştir. Örneğin enfeksiyona karşı epitelyal engelleri bozabildiği veya dolaşımdaki bağışıklık hücrelerini ortadan kaldırabildiği kaydedilmiştir [(Grant AJ et al. (88), Nogueira CV et al. (89), Peters KN et al. (90)]. Bazı durumlarda kaspazların doğrudan hedeflenmesinin bakteriyel patojenler tarafından efektör proteinler yoluyla gerçekleştirildiği rapor edilmiştir. Gerçekte bu tür bir yıkım enfekte olmuş hücrelerin yaşam süresini manipüle etmek ve/veya enfeksiyonlarını destekleyecek şekilde davranışlarını etkilemek amacıyla spesifik apoptotik yolları indüklemek veya inhibe etmek için farklı modlar geliştiren farklı bakteriyel patojenler ile

apoptotik kademelerin hemen hemen tüm noktalarında meydana gelebilmektedir. Bu nedenle kaspaz-3'ün mekanizmasının bozulması, konakçının enfeksiyona tepkisini önemli ölçüde zayıflatabildiği ve daha fazla bakteriyel enfeksiyonu teşvik ettiği belirtilmiştir [(Wall DM and McCormick BA (91)]. Yapılan çalışmalarda listeriozis enfeksiyonu sırasında splenositlerin tükenmesinin öncelikle kaspaz-3'e bağlı apoptotik hücre ölümünden kaynaklandığı bildirilmektedir [Carrero JA et al. (57), O'Connell R et al. (92), Zheng SJ et al. (93), Merrick JC et al. (94)]. Kaspaz-3, apoptozu başlatan ve genellikle apoptozu ölçmek için kullanılan temel belirteç olduğu vurgulanmıştır [Calame DG et al. (95)]. Bu çalışmada da kaspaz-3'ün immunopozitifliği etken ile enfekte olmuş hücrelerin ortadan kaldırılarak etkenin yayılmasına engele olabileceği ve böylece konakçı savunmasına katkı sunduğu düşünülmektedir.

Oksidatif stresin, serbest radikallerin üretimi ile endojen antioksidan sistem arasındaki dengesizlikten kaynaklandığı ve oksidatif stresin lipidleri, proteinleri ve nükleik asitleri olumsuz yönde etkilediği kaydedilmiştir [Halliwell B (64), Winterbourne CC (63)]. *Lm* ile deneysel enfekte edilen sığırlarda yapılan çalışmalarda, sığırların beyin dokusunda aşırı serbest radikal oluşumuna bağlı lipid oksidasyonunun meydana geldiği bildirilmiştir [Jaguezeski AM et al. (65)]. Sinir sisteminde oluşan patolojik bulguların aşırı nitrik oksitten kaynaklanabildiği rapor edilmiştir [Dawson VL et al. (77), Boje KM and Aroa PK (96), Calabrese V et al. (78)]. Bazı araştırmacılar, listerik ensefalitisin patogenezinde çeşitli NOS türlerinin güçlü ekspresyonunun gözlenebileceğini öne sürmüşlerdir [Karayigit MO and Dincel GC (29), Shin T et al. (97)]. Yapılan bir çalışmada pons ve medulla oblongata'da yer alan mikroapse odaklarındaki yangısal hücrelerde iNOS immünreaktivitesinin yüksek olduğu, bu durumun nitrik oksit sentezini artırdığı ve matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) aktivitesine katkıda bulunarak beyin ekstrasellüler matriksinde bozulmaya yol açabileceğini bildirilmiştir [Karakurt E ve ark. (98)]. Yapılan tez çalışmasında da pons, medulla oblongata ve beyincikte iNOS pozitif alanlar tespit edilmiş ve bu verilerin literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür. iNOS immünreaktivitesinin apoptozu indükleyebildiği ve listeria ile enfekte koyun santral sinir sisteminde nöropatolojinin oluşuma yol açtığı düşünülmektedir.

Vücutta önemli hasara neden olan oksidatif stresin, oksidanlar lehine gelişen bir durum olup, oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki hassas fizyolojik dengenin bozulmasını ifade ettiği kaydedilmiştir. Oksidanların olumsuz etkileri, çeşitli hücresel

bileşenlere ve moleküllere (hücre zarındaki lipidler ve proteinler ile mitokondriyal DNA dahil) saldırarak hücreleri istikrarsızlaştırmada kendini göstermekte olup, mutasyonlara veya hatta hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir [Sies H (99), Goriuc A et al. (100)]. Reaktif oksijen türlerinin DNA'daki guanin bazlarına kolayca saldırdığı ve sitozin yerine timidine bağlanabilen 8-OHdG oluşturduğu, buna dayanarak 8-OHdG seviyesi genellikle oksidatif strese bağlı bir mutagenезin biyobelirteci olarak kabul edildiği kaydedilmiştir. Örneğin, *Helicobacter pylori* ile ilişkili kronik atrofik gastritis ve mide kanserinde daha yüksek 8-OHdG seviyeleri not edilmiştir [Karayigit MO and Dincel GC (29), Young Ock C et al. (101)]. Yapılan bir çalışmada ekzojen 8-OHdG'nin stresle ilişkili mukozal hasarın hem yangıya dayalı hem de oksidatif stresle ilişkili hastalıklarında çok etkili olduğu, sentetik 8-OHdG'nin yangıya dayalı gastrointestinal hastalıklarının tedavisi ve yangıyla ilişkili gastrointestinal kanserinin önlenmesi için potansiyel bir aday olabileceği vurgulanmıştır. Ekzojen 8-OHdG'nin Rac-guanozin trifosfat bağlanmasını antagonize ederek veya gastrik yangı kaskadından sorumlu sinyalleri bloke ederek oksidatif stres kaynaklı gastritisi düzenleyen işlevsel bir molekül olabileceği bildirilmiştir. 8-OHdG hasarının DNA'da birikmesi, nörodejenerasyon ve kanser dahil çeşitli patolojik durumlara yol açabildiği, analiz edilen önemli ölçüde değiştirilmiş baz hasarı seviyesi, bu tür patolojiler için potansiyel olarak erken tanısal bir biyobelirteç olduğu vurgulanmıştır [Young Ock C et al. (101)]. *Listeria monocytogenes* ile ilgili yapılan bir çalışmada apoptozis ve nöropatolojinin karmaşık süreçler olduğu, nöronlardan türetilen patolojik nitrik oksit seviyelerinin apoptoza ve oksidatif stres veya nitrik oksit stresinin neden olduğu mitokondriyal DNA hasarına katkıda bulunduğu belirtilmiştir. *Lm*'in patogeneğinde, hedef DNA mitokondriyaldir, bu da hücre solunum sisteminin birincil hedef olduğunu gösterir [Karayigit MO and Dincel GC (29)]. Bu tez çalışmasında *Lm* ile doğal enfekte koyunların SSS'de şekillenen nöron hasarının hücrede artan oksidatif stres sonucunda meydana geldiği ve bu durumun 8-OHdG'nin artışına neden olduğu yapılan immunohistokimyasal boyamalar sonucunda elde edilen immunopozitif reaksiyonla anlaşılmaktadır. Ayrıca sonuçların hücrede meydana gelen 8-OHdG'nin mitokondriyal DNA hasarının hücrenin solunum sistemini etkilediğine dair bildirilen ilgili literatürlerle de uyumlu olduğu görüldü.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER:

1. Bu tez çalışmasında *Listeria monocytogenes* ile doğal enfekte koyunların santral sinir sistemine ait ve hastalığın patolojik bulgularını sergileyen rombensefalon bölgesinden alınan dokulara hastalığın patolojik mekanizmasına katkı sunacak veriler elde edildi.
2. Histopatolojik incelemelerde elde edilen verilerin daha önceki literatürlerle uyumlu olduğu saptandı.
3. İmmunohistokimyasal olarak yapılan incelemelerde, etkenin varlığı ortaya konulmuştur. Bu verinin diğer literatürlerle uyumlu olduğu görüldü.
4. İmmunohistokimyasal olarak yapılan kaspaz-3, GFAP, iNOS ve 8-OHdG immunopozitifliğinin hastalığın patolojik ve dolayısıyla klinik bulguların şekillenmesinde önemli roller oynadığı kanısına varıldı.
5. Bu tezde kullanılan tüm biyobelirteçlerin, etkenin oluşturmuş olduğu ve ürettiği toksinin sonucunda hücre içi şekillenen koruyucu mekanizmalar olduğu, ancak etken tarafından oluşturulan etkinin şiddetinin yüksek olmasına bağlı olarak hücre zedelenme süreçlerinde rol oynayabilecekleri düşünüldü.
6. Biyobelirteçlerden özellikle 8-OHdG'nin ekzojen olarak veya ilaç sanayisinde geliştirilmesiyle hastalığın tedavi sürecine ciddi oranda katkı sunabileceği düşünüldü.

7. KAYNAKLAR

1. **Gray ML, Killinger A.** *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol Rev*, **1966**; 30(2):309–382.
2. **Bagatella S, Tavares-Gomes L, Oevermann A.** *Listeria monocytogenes* at the interface between ruminants and humans: A comparative pathology and pathogenesis review. *Vet Pathol*, **2022**; 59(2); 186–210.
3. **Doijad SP, Poharkar KV, Kale SB, Kerkar S, Kalorey DR, Kurkure NV, Rawool DB, Malik SVS, Ahmad RY, Hudel M, Chaudhari SP, Abt B, Overmann J, Weigel M, Hain T, Barbuddhe SB, Chakraborty T.** *Listeria goensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, **2018**; 68(10); 3285–3291.
4. **Faleiro ML, Andrew P, Power D.** Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. *Int J Food Microbiol*, **2003**; 84(2):207–216.
5. **Czuprynski C, Kathariou S, Poulsen K.** *Listeria*. In: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Eds. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*, Iowa: Wiley-Blackwell; **2010**: 167–187.
6. **Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J.** *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev*, **2001**; 14(3):584–640.
7. **Wagner M, Melzner D, Bago Z, Winter P, Egerbacher M, Schilcher F, Zangana A, Schoder D.** Outbreak of clinical listeriosis in sheep: evaluation from possible contamination routes from feed to raw produce and humans. *J Vet Med Ser*, **2005**; 52: 278–283.
8. **Maxie MG, Youssef S.** Nervous Systems. In: Maxie MG, Eds. *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*, China: Saunders Elsevier; **2007**: 405–408.
9. **Poulsen KP, Czuprynski CJ.** Pathogenesis of listeriosis during pregnancy. *Anim Health Res Rev*, **2013**; 14(1):30–39.
10. **Schlech WF.** Epidemiology and clinical manifestations of *Listeria monocytogenes* infection. *Microbiol Spectrum*, **2019**; 7(3); GPP3-0014-2018.
11. **Low J, Renton C.** Septicaemia, encephalitis and abortions in a housed flock of sheep caused by *Listeria monocytogenes* type 1/2. *Vet Rec*, **1985**; 116(6):147–150.
12. **Low J, Donachie W.** A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Vet J*, **1997**; 153(1):9-29.
13. **Wesley IV.** Listeriosis in animals. In: Ryser E, Marth E, Eds. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, New York: Taylor & Francis; **2007**: 73–102.
14. **Bartt R.** *Listeria* and atypical presentations of *Listeria* in the central nervous system. *Semin Neurol*, **2000**; 20(03):361–374.

15. **Haligur M, Aydogan A, Ozmen O, Ipek V.** Immunohistochemical evaluation of natural cases of encephalitic listeriosis in sheep. *Biotech. Histochem*, **2019**; 94(5):341-347.
16. **Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxeet RV.** Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*, **1999**; 5(5):607–625.
17. **European Commission.** Commission regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Off J Eur Union L*, **2005**; 338:1–26.
18. **Oevermann A, Di Palma S, Doherr MG, Abri, C, Zurbriggen A, Vandevelde M.** Neuropathogenesis of naturally occurring encephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in ruminants. *Brain Pathol*, **2010**; 20(2):378–390.
19. **Cone LA, Leung MM, Byrd RG, Annunziata GM, Lam RY, Herman BK.** Multiple cerebral abscesses because of *Listeria monocytogenes*: three case reports and a literature review of supratentorial listerial brain abscess (es). *Surg Neuro*, **2003**; 59(4):320–328.
20. **Charlton KM, Garcia MM.** Spontaneous listeric encephalitis and neuritis in sheep. Light microscopic studies. *Vet Pathol*, **1977**; 14(4):297–313.
21. **Oevermann A, Zurbriggen A, Vandevelde M.** Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in humans and ruminants: a zoonosis on the rise? *Interdiscip Perspect Infect Dis*, **2010**; 632513.
22. **Henke D, Rupp S, Gaschen V, Stoffel MH, Frey J, Vandevelde M, Oevermann A.** *Listeria monocytogenes* spreads within the brain by actin-based intra-axonal migration. *Infect Immun*, **2015**; 83(6):2409–2419.
23. **Choudhury N, Khan A, Tzvetanov I, Garcia-Roca R, Oberholzer J, Benedetti E, Jeon H.** Cerebellar abscess caused by *Listeria monocytogenes* in a liver transplant patient. *Transpl Infect Dis*, **2013**; 15(6):E224–E228.
24. **Charlier C, Disson O, Lecuit M.** Maternal-neonatal listeriosis. *Virulence*, **2020**; 11(1):391–397.
25. **Barlow R, McGorum B.** Ovine listerial encephalitis: analysis, hypothesis and synthesis. *Vet Rec*, **1985**; 116(9):233–236.
26. **Aguilar-Bultet L, Nicholson P, Rychener L, Dreyer M, Gozel B, Origgi FC, Oevermann A, Fey J, Falquet L.** Genetic separation of *Listeria monocytogenes* causing central nervous system infections in animals. *Front Cell Infect Microbiol*, **2018**; 8:20.
27. **Weinstock D, Horton SB, Rowland PH.** Rapid diagnosis of *Listeria monocytogenes* by immunohistochemistry in formalin-fixed brain tissue. *Vet Pathol*, **1995**; 32:193–195.
28. **Ilhan F, Ulusoy Y, Haligur M.** Matrix metalloproteinase expression in sheep with listerial meningoencephalitis. *Res Vet Sci*, **2012**; 92(2):269-72.
29. **Karayigit MO, Dincel GC.** Role of ADAMTS-13 and nNOS expression in neuropathogenesis of listeric encephalitis of small ruminants. *Biotech Histochem*, **2020**; 95(8):584-596.

30. **Bongcam-Rudloff E, Nister M, Betsholtz C, Wang JL, Stenman G, Huebner K, Croce CM, Westermark B.** Human glial fibrillary acidic protein: complementary DNA cloning, chromosome localization, and messenger RNA expression in human glioma cell lines of various phenotypes. *Cancer Res*, **1991**; 51(5):1553-60.
31. **Isaacs A, Baker M, Wavrant-De Vrièze F, Hutton M.** Determination of the gene structure of human GFAP and absence of coding region mutations associated with frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17. *Genomics*, **1998**; 51(1):152–154.
32. **Jacque CM, Vinner C, Kujas M, Raoul M, Racadot J, Baumann NA.** Determination of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human brain tumors. *Journal of the Neurological Sciences*, **1978**; 35(1):147–155.
33. **Sjölin K, Kultima K, Larsson A, Freyhult E, Zjukovskaja C, Alkass K, Burman J.** Distribution of five clinically important neuroglial proteins in the human brain. *Molecular Brain*, **2022**; 15(1):52.
34. **Tardy M, Fages C, Le Prince G, Rolland B, Nunez J.** Regulation of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and of its encoding mRNA in the developing brain and in cultured astrocytes. *Adv Exp Med Biol*, **1990**; 265:41–52.
35. **Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E.** Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat Rev Neurol*, **2006**; 7:41–53.
36. **Lee JD, Tsai LY, Chen CH, Wang JJ, Hsiao JK, Yen CM.** Blood–brain barrier dysfunction occurring in mice infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *Acta Trop*, **2006**; 97:204–211.
37. **Van Horssen J, Brink BP, de Vries HE, van der Valk P, Bo L.** The blood-brain barrier in cortical multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol*, **2007**; 66:321–328.
38. **Vijayan VK, Lee YL, Eng LF.** Increase in glial fibrillary acidic protein following neural trauma. *Mol Chem Neuropathol*, **1990**; 13:107–118.
39. **Nikolskaia OV, Lima APCDA., Kim YV, Eccles JDL, Fukuma T, Scharfstein J, Grab D.** Blood–brain barrier traversal by African trypanosomes requires calcium signaling induced by parasite cysteine protease. *J Clin Invest*, **2006**; 116:2739–2747.
40. **Liedtke W, Edelmann W, Bieri PL, Chiu FC, Cowan NJ, Kucherlapati R, Raine CS.** GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron*, **1996**; 17(4):607–615.
41. **Paetau A, Elovaara I, Paasivuo R, Virtanen I, Palo J, Haltia M.** Glial filaments are a major brain fraction in infantile neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Acta Neuropathologica*, **1985**; 65 (3–4):190–194.
42. **Tuccari G, Trombetta C, Giardinelli MM, Arena F, Barresi G.** Distribution of glial fibrillary acidic protein in normal and gliotic human retina. *Basic and Applied Histochemistry*, **1986**; 30(4):425–432.
43. **Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J.** Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, **1996**; 87(2):171.

44. Gervais FG, Xu D, Robertson GS, Vaillancourt JP, Zhu Y, Huang J, LeBlanc A, Smith D, Rigby M, Shearman MS, Clarke EE, Zheng H, Van Der Ploeg LH, Ruffolo SC, Thornberry NA, Xanthoudakis S, Zamboni RJ, Roy S, Nicholson DW. Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. *Cell*, **1999**; 97(3):395–406.
45. Harrington HA, Ho KL, Ghosh S, Tung KC. Construction and analysis of a modular model of caspase activation in apoptosis. *Theoretical Biology & Medical Modelling*, **2008**; 5(1):26.
46. Salvesen GS. Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell Death and Differentiation*, **2002**; 9(1):3–5.
47. Thorburn A. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal*, **2004**;16:139–144.
48. Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, Bus CJ, Kadkhoda K, Wiehce E, Halayko AJ, Los M. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *Journal of Medical Genetics*, **2009**; 46(8):497–510.
49. Boatright KM, Salvesen G.S. Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology*, **2003**; 15(6):725–31.
50. Gallaher BW, Hille R, Raile K, Kiess W. Apoptosis: live or die-hard work either way. *Hormone and Metabolic Research*, **2001**; 33(9):511–9.
51. Katunuma N, Matsui A, Le QT, Utsumi K, Salvesen G, Ohashi A. Novel procaspase-3 activating cascade mediated by lysoapoptases and its biological significances in apoptosis. *Advances in Enzyme Regulation*, **2001**; 41(1):237–50.
52. Perry DK, Smyth MJ, Stennicke HR, Salvesen GS, Duriez P, Poirier GG, Hannun YA. Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3. A novel target for zinc in the inhibition of apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, **1997**; 272(30):18530–3.
53. Li P, Nijhawan D, Wang X. Mitochondrial activation of apoptosis. *Cell*, **2004**; 116:(2 Suppl):57–9.
54. Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: Signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2007**; 8:405–413.
55. Cossart P. The listeriolysin O gene: a chromosomal locus crucial for the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Infection*, **1988**; 16 Suppl 2:157–9.
56. Petrisic N, Kozorog M, Aden S, Podobnik M, Anderluh G. The molecular mechanisms of listeriolysin O-induced lipid membrane damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **2021**; 1863(7):183604.
57. Carrero JA, Calderon B, Unanue ER. Listeriolysin O from *Listeria monocytogenes* is a lymphocyte apoptogenic molecule. *J Immunol*, **2008**; 172(8):4866–4874.

58. Wiktorczyk-Kapischke N, Skowron K, Walecka-Zacharska E. Genomic and pathogenicity islands of *Listeria monocytogenes*—overview of selected aspects. *Front Mol Biosci*, **2023**; 10:1161486.
59. Camejo A, Carvalho F, Reis O, Leitão E, Sousa S, Cabanes D. The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence*, **2011**; 2(5):379–394.
60. Pilger A, Rudiger HW. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. *Int Arch Occup Environ Health*, **2006**; 80:1-15.
61. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxidative stress and redox regulation: adaptation, damage, repair, senescence and death. In: Free radicals in biology and medicine. 4th ed. London, United Kingdom: Oxford University Press; **2015**: 187-267.
62. Xing H, Li S, Wang Z, Gao X, Xu S, Wang X. Oxidative stress response and histopathological changes due to atrazine and chlorpyrifos exposure in common carp. *Pest Biochem Phys*, **2012**; 103:74–80.
63. Winterbourne CC. Are free radicals involved in thiol-based redox signaling? *Free Rad Biol Med*, **2015**; 80:164–170.
64. Halliwell B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat Res*, **1990**; 1(2):37–52.
65. Jaguzeski AM, Perin G, Rhoden LA, da Silva TM, da Silva AS, Mendes RE, Bottari NB, Faccin T, Baldissera MD, Morsch VM, Schetinger MR, Giongo JL, da Silva AS. Experimental infection of cattle with *Listeria monocytogenes*: participation of purinergic metabolism in disease pathogenesis. *Microb Pathog*, **2018**; 122:25–29.
66. Weller R. Could the sun be good for your heart? Archived 2014-02-16 at the Wayback Machine TedxGlasgow. Filmed March **2012**, posted January **2013**.
67. Roszer T. The Biology of Subcellular Nitric Oxide. 1. Baskı, London: Springer, **2012**: 19-46.
68. Perez KM, Laughon M. Sildenafil in Term and Premature Infants: A Systematic Review. *Clinical Therapeutics*, **2015**; 37(11):2598–2607.
69. Stryer L. Biochemistry. 4. Baskı, New York: W.H. Freeman and Company, **1995**: 732.
70. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*, **1997**; 15:323–350.
71. Schleifer KW, Mansfield JM. Suppressor macrophages in African trypanosomiasis inhibit T cell proliferative responses by nitric oxide and prostaglandins. *J Immunol*, **1993**; 151:5492–5503.
72. Tamir S, de Rojas WT, Wishnok JS, Tannenbaum SR. DNA damage and genotoxicity by nitric oxide. *Methods Enzymol*, **1996**; 269:230–243.

73. **Pfister H, Remer KA, Brcic M, Fatzer R, Christen S, Leib S, Jungi TW.** Inducible Nitric Oxide Synthase and Nitrotyrosine in Listeric Encephalitis: A Cross-species Study in Ruminants. *Vet Pathol*, **2003**; 39:190–199.
74. **Jungi TW, Pfister H, Sage, H, Fatzer R, Vandeveld M, Zurbriggen A.** Comparison of inducible nitric oxide synthase expression in the brains of *Listeria monocytogenes*. *Vet Pathol*, **2002** ;39:2.
75. **Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA.** Nitric oxide: physiology, pathology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, **1991**; 11:109–142.
76. **Picón PP, Garcia BJ, Muñoz FJ.** Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, **2018**; 18:3045–3046.
77. **Dawson VL, Dawson TM, London ED, Brecht DS, Snyder SH.** Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cultured cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1991**; 88:6368–6371.
78. **Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM.** Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci*, **2007**; 8:766–775.
79. **Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA.** Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1995**; 92:7162–7166.
80. **Jungi TW, Pfister H, Sager H, Fatzer R, Vandeveld M, Zurbriggen A.** Comparison of inducible nitric oxide synthase expression in the brain of *Listeria monocytogenes*-infected cattle, sheep and goats and in macrophages stimulated in vitro. *Infect Immun*, **1997**; 65:5279–5288.
81. **Green L, Morgan K.** Descriptive epidemiology of listerial meningoencephalitis in housed lambs. *Prev Vet Med*, **1994**; 18(2):79–87.
82. **Morin DE.** Brainstem and cranial nerve abnormalities: listeriosis, otitis media/interna, and pituitary abscess syndrome. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. **2004**; 20(2):243–273.
83. **Wilesmith J, Gitter M.** Epidemiology of ovine listeriosis in Great Britain. *Vet Rec*, **1986**; 119(19):467–470.
84. **Akiyama Y, Asahi O, Hosoda T.** Studies on the mechanism of infection of the brain with *Listeria monocytogenes*. *Am J Vet Res*, **1957**; 118(66):147–157.
85. **Brugère-Picoux J.** Ovine listeriosis. *Small Ruminant Res*, **2008**; 76(1–2):12–20.
86. **Braun U, Stehle C, Ehrensperger E.** Clinical findings and treatment of listeriosis in 67 sheep and goats. *Vet Rec*, **2002**; 150(2):38–42.
87. **Drams S, Le'vi S, Triller A, Cossart P.** Entry of *Listeria monocytogenes* into Neurons Occurs by Cell-to-Cell Spread: an In Vitro Study. *Infection and Immunity*, **1998**; 66 (9): 4461–4468.

88. Grant AJ, Sheppard M, Deardon R, Brown SP, Foster G, Bryant CE, Maskel DJ, Mastroeni P. Caspase-3-dependent phagocyte death during systemic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection of mice. *Immunology*, **2008**; 125: 28–37.
89. Nogueira CV, Lindsten T, Jamieson AM, Case CL, Shin S, Thompson CB, Roy CR. Rapid pathogen-induced apoptosis: a mechanism used by dendritic cells to limit intracellular replication of *Legionella pneumophila*. *PLoS Pathogens*, **2009**; 5: e1000478.
90. Peters KN, Dhariwala MO, Hughes JMH, Brown CR, Anderson DM. Early apoptosis of macrophages modulated by injection of *Yersinia pestis* YopK promotes progression of primary pneumonic plague. *PLoS Pathogens* **2013**; 9: e1003324.
91. Wall DM, McCormick BA. Bacterial secreted effectors and caspase-3 interactions. *Cellular Microbiology* **2014**; 16(12):1746–1756.
92. O'Connell RM, Saha SK, Vaidya SA, Bruhn KW, Miranda GA, Zarnegar B, Perry AK, Nguyen BO, Lane TF, Taniguchi T, Miller JF, Cheng G. Type I interferon production enhances susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *J. Exp. Med.* **2004**; 200:437–445.
93. Zheng SJ, J Jiang H, Shen, Chen YH. Reduced apoptosis and ameliorated listeriosis in TRAIL-null mice. *J. Immunol*, **2004**; 173:5652–5658.
94. Merrick JC, Edelson BTV, Bhardwaj PE, Swanson, Unanue ER. Lymphocyte apoptosis during early phase of *Listeria* infection in mice. *Am. J. Pathol*, **1997**; 151: 785–792.
95. Calame DG, Mueller-Ortiz SL, Morales JE, Wetsel RA. The C5a Anaphylatoxin Receptor (C5aR1) Protects against *Listeria monocytogenes* Infection by Inhibiting Type 1 IFN Expression. *The Journal of Immunology*, **2014**; 193(10):5099–5107.
96. Boje KM, Aroa PK. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res*, **1992**; 7:250–256.
97. Shin T, Weinstockm D, Castro D, Acland H, Walter M, Kim H, Ahn M, Purchase HG. Neuronal constitutive and inducible nitric oxide synthase expression in the brains of *Listeria monocytogenes* infected cattle. *Acta Vet Brno*, **2001**; 70:43–47.
98. Karakurt E, Büyük F, Beytut E, Dağ S, Çelebi Ö, Akça D, Nuhuğlu H, Çelik E, Yıldız A. Evaluation of MMP-9 and iNOS expressions in sheep with encephalitic listeriosis. *Vet Hekim Der Derg*, **2021**; (1): 31-41,
99. Sies H. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. *Exp. Physiol*, **1997**; 82:291–295.
100. Goriuc A, Cojocaru KA, Luchian I, Ursu RG, Butnaru O, Foia L. Using 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine (8-OHdG) as a Reliable Biomarker for Assessing Periodontal Disease Associated with Diabetes. *Int. J. Mol. Sc*, **2024**; 25:1425.
101. Young Ock C, Kim EH, Choi DJ, Lee HJ, Hahm KB, Chung HM. 8-Hydroxydeoxyguanosine: Not mere biomarker for oxidative stress, but remedy for oxidative stress-implicated gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol*, **2012**; 28:18(4):302-308.

ÖZGEÇMİŞ

