

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MANNHEIMIA HAEMOLYTICA’NIN SIĞIR EPİTEL
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİSİ**

Ebru YAVRUCU

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

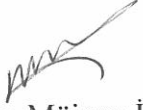
**DANIŞMAN
Prof. Dr. K. SERDAR DİKER**

2008- ANKARA

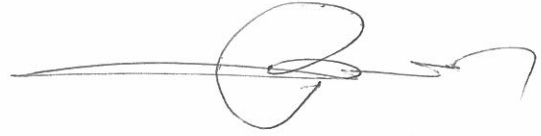
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Mikrobiyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 03/11/2008

Prof.Dr. Nejat AYDIN
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı



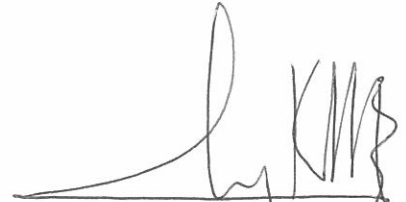
Prof.Dr. Müjgan İZGÜR
Ankara Üniversitesi



Prof.Dr. K. Serdar DİKER
Ankara Üniversitesi



Prof.Dr.Hakan YARDIMCI
Ankara Üniversitesi



Prof.Dr. Aykut ÖZKUL
Ankara Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	ix
1. GİRİŞ	1
2. GEREÇ VE YÖNTEM	18
2.1. <i>M. haemolytica</i> suşu	18
2.2. Epitel Hücreleri	18
2.3. Alveolar Makrofajlar	18
2.4. Besiyerleri	18
2.4.1. Colombia Blood Agar Base NO.2 (CBA)	19
2.4.2. %0.5 Maya Ekstraktlı Brain Heart Infusion Broth (BHI)	19
2.4.3. RPMI–1640 Medium	19
2.4.4. Diğer Besiyerleri	19
2.5. Solüsyonlar	20
2.5.1. Phosphate Buffered Saline (PBS)	20
2.5.2. %4'lük Paraformaldehit Solüsyonu	20
2.5.3. %0.2'lik Triton X–100 Solüsyonu	21
2.5.4. Denatürasyon Solüsyonu	21
2.6. Lökotoksin A Geni için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	21
2.6.1. Bakteriyel Genomik DNA Ekstraksiyonu	22
2.6.2. PCR Amplifikasyon Koşulları	23
2.7. Hücre Kültürü	24
2.7.1. Epitel Hücre İzolasyonu ve Hücre Kültürü Hazırlanması	24

2.7.2. Alveolar Makrofaj İzolasyonu	24
2.8. İnokulumların Hazırlanması	25
2.8.1. Lökotoksin Hazırlanması	25
2.8.2. Canlı <i>M. haemolytica</i> Kültürünün Hazırlanması	26
2.8.3. <i>M. haemolytica</i> Kaynatılmış Tüm Hücrelerin Hazırlanması	26
2.9. Hücre Kültürüne Deneysel İnokülasyon	26
2.10. Canlı <i>M. haemolytica</i> Kültürü, LKT ve Kaynatılmış Tüm Hücrenin Türbinata Epitel Hücreleri ve Makrofajlar Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi	27
2.11. Apoptozisin Belirlenmesi	28
2.11.1. TUNEL (TdT-mediated dUTP-X nick end Labeling)	28
2.11.1.1. Pozitif Kontrollerin Hazırlanması	29
2.11.2. DNA Agaroz Jel Elektroforezi	29
2.11.2.1. Hücresel Genomik DNA İzolasyonu	30
2.11.2.2. Elektroforez	31
2.11.3. Acridine Orange- Etidium Bromide Boyama	31
2.12. Reverse Transkriptaz- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile CD18/CD11a (LFA-1) ve TLR-4 (Tool-like receptor 4) Gen Transkripsiyonunun İncelenmesi	32
2.12.1. Hücresel mRNA Ekstraksiyonu	33
2.12.2. cDNA Sentezi	33
2.12.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	34
3. BULGULAR	36
3.1. <i>M. haemolytica</i> Suşları PCR Bulguları	36
3.2. Canlı <i>M. haemolytica</i> Kültürü, LKT ve Kaynatılmış Tüm Hücrenin Türbinata Epitel Hücreleri ve Makrofajlar Üzerindeki Etkisi	37
3.3. Apoptozis Bulguları	37
3.3.1. TUNEL Testi Bulguları	37
3.3.1.1. Canlı <i>M. haemolytica</i> Kültürünün Etkilediği Turbinata Hücrelerinde TUNEL Bulguları	38
3.3.1.2. LKT'nin Etkilediği Turbinata Hücrelerinde TUNEL Bulguları	39

3.3.1.3.Kaynatılmış Tüm Hücrenin Etkilediği Turbinata Hücrelerinde TUNEL Bulguları	39
3.3.1.4.Canlı <i>M. haemolytica</i> Kültürünün Etkilediği Makrofajlarda TUNEL Bulguları	40
3.3.1.5. LKT'nin Etkilediği Makrofajlarda TUNEL Bulguları	41
3.3.1.6. Kaynatılmış Tüm Hücrenin Etkilediği Makrofajlarda TUNEL Bulguları	41
3.3.2. DNA AgaroZ Jel Elektroforezi	44
3.3.3. Acridine Orange- Ethidium Bromide Boyama Bulguları	45
3.4. CD18/CD11a ve TLR-4 Gen Transkripsiyonu için RT-PCR Bulguları	46
4. TARTIŞMA	48
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	56
ÖZET	58
SUMMARY	59
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	65

ÖNSÖZ

Sığırların solunum sistemi enfeksiyonları, hayvan sağlığını en çok etkileyen ve ekonomik kayıplara yol açan hastalıkların içinde yer almaktadır. Sığır pnömonilerinin oluşmasında genellikle çevresel faktörlerin ve birden fazla etiyolojik ajanın rol oynadığına inanılmaktadır. Çevresel faktörler içinde, hayvan nakli, aşılama, yem değişiklikleri, barınak ve iklim koşullarının hastalığa hazırlayıcı faktörler olduğu kabul edilmektedir. Hastalık genellikle viral ve bakteriyel ajanların beraber oluşturduğu miks enfeksiyonlar şeklinde olmaktadır. *Mannheimia haemolytica* enfeksiyonda primer ajan olarak bulunmakta ve lezyonların çoğundan sorumlu tutulmaktadır.

Gelişmiş organizmaların hücrelerinde apoptozis olarak adlandırılan, nükleer ve sitoplazmik yoğunlaşma, azalmış mitokondrial membran potansiyeli, hücre büzülmesi, sitoplazmik azalma, zeiozis (dinamik plazma membran kabarması), DNA fragmentasyonu, ve membranla kaplı hücresel parçalanma (apoptotik parçacıklar) ile karakterize bir hücre ölüm mekanizması görülmektedir. Bu mekanizmayı mikroorganizmalar, immun sistem hücrelerinden kaçmak için hastalık patogenezelelerinde kullanırlar. *M. haemolytica* bu oluşumu içeren virulens faktörleri ile immun sistem hücrelerinden kaçmak için bu mekanizmayı kullanan mikroorganizmalar arasındadır.

Apoptozis, immun sistem hücrelerinin öldürülmesi bakterinin konak immun hücrelerinden kaçması, hayatta kalması ve konakta kolonize olmasını olanaklı kılmaktadır. Bu çalışmada, sığır epitel hücrelerde, *M. haemolytica* ve *M. haemolytica* lökotosin uyarımlı apoptozisin belirlenmesi amaçlanmış ve epitel hücre apoptozisinin *M. haemolytica* kaynaklı sığır mannheimiozisinin patogenezelelerine bir rolünün olup olmadığının araştırılması amaçlanmış ve bu amaçla *M. haemolytica* ve *M. haemolytica* lökotosininin sığır epitel hücrelerinde apoptotik etkisi incelenmiştir.

Bu ilginç ve orijinal konunun seçilmesinde ve çalışmaların yürütülmesinde büyük katkısını gördüğüm tez danışmanım Prof. Dr. K. Serdar DİKER başta olmak üzere her konuda yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Aykut ÖZKUL ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri; Prof. Dr. Nejat AYDIN, Prof. Dr. Müjgan İZGÜR, Prof. Dr. Hakan YARDIMCI, Prof. Dr. Ömer Memduh ESENDAL, Prof. Dr. Mehmet AKAN 'a, çalışmalar süresince yardımlarından dolayı Vet. Hekim Mahur TURAN'a, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı araştırma görevlilerine, doktora ve yüksek lisans yapan arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

Ca ²⁺	Kalsiyum
CPS	Kapsüler polisakkarit
EF-2	Elengasyon faktörü 2
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Fe	Demir
IL-1	İnterlökin-1
IL-8	İnterlökin-8
IROMPs	Demir bağlayıcı dış membran proteinleri
K ⁺	Potasyum
kDa	Kilodalton
LFA-1	Antijen 1 ile birleşmiş lenfosit fonksiyonu
LKT	Lökotoksin
LktA	Lökotoksin geni
LPS	Lipopolisakkarit
M	Molar
ManNAc	<i>N</i> -asetilmannozamin
ManNAcA	Asetilmannozaminüronik asit
MHC	Major histocompatibility complex
OMP	Dış membran proteinleri
RTX	Repeats-in-toxin
TLR-4	Toll-like receptor 4
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase nick end labeling
µl	Mikrolitre

ŞEKİLLER

Şekil 3.1. LktA gen düzeyinde <i>M. haemolytica</i> suşlarının PCR analizi sonucu	36
Şekil 3.2. TUNEL testinde turbinata hücre kontrolleri A) pozitif kontrol, B) negatif kontrol	38
Şekil 3.3. TUNEL testinde turbinata hücrelerinde, apoptotik hücre görünüşleri	43
Şekil 3.4. Deneysel infeksiyonun18.saatinde DNA agaroz jel elektroforezi sonuçları	44
Şekil 3.5. Acridine orange-ethidium bromide boyamada apoptotik ve nekrotik hücre görünüşleri	46
Şekil 3.6. CD18/CD11a ve TLR-4 gen transkripsiyonu için RT-PCR Bulguları	47

ÇİZELGELER

- Çizelge 1.1.** *Mannheimia haemolytica*'nın önemli biyokimyasal testleri ve identifikasyon kriterleri 2
- Çizelge 3.1.** Canlı *M. haemolytica* kültürünün etkilediği turbinata hücrelerinde zaman ve doz bağımlı apoptotik hücre sayıları ve toplam hücre sayısına göre yüzdesi 38
- Çizelge 3.2.** LKT'nin etkilediği turbinata hücrelerinde zaman ve doz bağımlı apoptotik hücre sayıları ve toplam hücre sayısına göre yüzdesi 39
- Çizelge 3.3.** Kaynatılmış tüm hücrenin etkilediği turbinata hücrelerinde zaman ve doz bağımlı apoptotik hücre sayıları ve toplam hücre sayısına göre yüzdesi 40
- Çizelge 3.4** Canlı *M. haemolytica* kültürünün etkilediği makrofajlarda zaman ve doz bağımlı apoptotik hücre sayıları ve toplam hücre sayısına göre yüzdesi 40
- Çizelge 3.5.** LKT'nin etkilediği makrofajlarda zaman ve doz bağımlı apoptotik hücre sayıları ve toplam hücre sayısına göre yüzdesi 41
- Çizelge 3.6.** Kaynatılmış tüm hücrenin etkilediği makrofajlarda zaman ve doz bağımlı apoptotik hücre sayıları ve toplam hücre sayısına göre yüzdesi 42
- Çizelge 3.7.** Turbinata hücrelerinde ve makrofajlarda doz bağımlı apoptotik hücre sayıları ve toplam hücre sayısına göre yüzdesi 45

1.GİRİŞ

Sığır pnömonik mannheimiozisi (pastörellozis) olarak bilinen solunum yolu hastalığı, tüm dünyada et ve süt sığırı yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Rice ve ark., 2008; Jeyaseelan ve ark., 2002; Sun ve ark., 2000; Tuhumbikat ve ark. 2005). Enfeksiyon, genellikle bakteriyel ve viral etkenlerin beraber oluşturduğu miks enfeksiyonlar şeklinde görülmekte ve *Mannheimia haemolytica* enfeksiyonda primer etken olarak bulunmaktadır (Jeyaseelan ve ark., 2002; Murphy ve ark.,1995).

M. haemolytica Bacteria aleminin, Proteobacteria bölümü, Gamma proteobacteria sınıfı *Pasteurellales* takımı, Pasteurellaceae ailesi, *Mannheimia* cinsi içerisinde yer alır. *M. haemolytica*'yı içine alan *Pasteurellaceae* familyasına ait olan organizmalar çeşitli kanatlı, memeli ve amfibik konakçıların solunum, sindirim ve aynı zamanda üreme sistemlerinde bulunmaktadır. Louis Pasteur tarafından 19. yüzyılın sonunda ilk patojenik *Pasteurella*'nın izolasyonu ve tanınmasından bu yana, *Pasteurellaceae* familyası üyelerinin uygun identifikasyonu tartışma kaynağı olmuştur. Diğer patojenik önemi olan bakterilerin aksine, bu bakteri familyası üyelerinin tür ayrımında ticari identifikasyon kitlerinin güvenilir olmadığı gözlenmiştir. Geçen iki yüzyıl boyunca 16S rRNA sekans kombinasyonu ve diğer moleküler teknikler, *Pasteurellaceae familyasında* bulunan birçok yeni cins, resmen tanınan yaklaşık 58 tür ve adlandırılmamış 25 takıma ışık tutmuştur. Şimdiye kadar bu familya içinde belirlenen genuslar *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Histophilus*, *Lonepinella*, *Phocoenobacter*, *Gallibacterium*, *Volucribacter*, *Nicoletella* ve *Avibacterium*'dur (Carty, 2005).

M. haemolytica gram negatif, hareketsiz, sporsuz, kapsüllü, kokobasil tarzında, fermentatif, oksidaz pozitif, katalaz pozitif, fakültatif

anaerobik özellikteki etken *Mannheimia* cinsinin önemli bir türüdür. *M. haemolytica* kolonileri koyun kanlı agarda 37°C'de 24 saat içerisinde düzgün kenarlı, S-tipli, grimsi, 1-2 mm çapında koloniler meydana getirir. Çoğu suşu sığır, koyun ve tavşan kanlı agarda β -hemoliz gösterir. Etken, buyyonu homojen olarak bulandırır ve dipte tortu oluşturarak ürer. MacConkey agarda laktozu fermente ettiği için küçük, kırmızı, toplu iğne başı büyüklüğünde koloniler meydana getirir. TSI (Triple Sugar Iron) agarda glukoz, laktoz ve sükrozu fermente eder, ancak, gaz ve H₂S oluşturmada ürer (Çizelge 1.1) (Quinn ve ark., 1999). Bakteri üreaz negatif oluşu ile *Actinobacillus* cinsi türlerinin birçoğundan, mannitol-pozitif oluşu ile de *Haemophilus* cinsi türlerinin birçoğundan ayrılır (Winn ve ark.,2006).

Çizelge 1.1. *Mannheimia haemolytica*'nın önemli biyokimyasal testleri ve identifikasyon kriterleri (Quinn ve ark., 1999; Winn ve ark.,2006)

Biyokimyasal Özellikler		<i>M. haemolytica</i>
Oksidaz		+
β hemoliz		+
MC'de agarda üreme		+
Hareket		-
Üre		-
İndol		-
Nitrat		+
Üreaz		-
TSI agarda	Glukoz	+
	Sukroz	+
	Laktoz	+
	H ₂ S	-
Ornitin dekarboksilaz		+
Maltoz		+
Arabinoz		+
Trehaloz		-
Mannitol		+

Bakterinin ilk başarılı serotiplendirilmesi Biberstein ve ark. (1960) tarafından indirekt hemaglutinasyon testi ile gerçekleştirilmiştir. Bu tiplendirmeye temel olan tip spesifik yapıların eriyebilir ve çıkartılabilir nitelikte olduğu bildirilmiştir. Bunu takiben Smith (1961) *P. haemolytica* suşlarını biyokimyasal özelliklerine ve çeşitli hastalık tablolarındaki dağılımlarına göre iki farklı biyotipe ayırmış ve arabinozu fermente eden *P. haemolytica* suşları A, trehalozu fermente eden *P. haemolytica* suşları ise T biyotip olarak belirtilmiştir. On iki A ve dört T biyotip identifiye edilmiştir.

Yapılan nükleik asit homoloji protein ve profillerinin poliakrilamid jel elektroforezi çalışmaları sonucunda A ve T biyotipleri arasındaki heterojenite gösterilmiş ve T biyotipinin *P. trehalosi* olarak adlandırılabilceği açıklanmıştır (Diker ve ark., 1995). Bunun sonucunda 1990'da T biyotipi *P. trehalosi* olarak tekrar sınıflandırılmış ve daha sonra ismi *Bibersteinia trehalosi* olarak değiştirilmiştir (Rice ve ark., 2008; Zecchinon ve ark., 2005). Daha sonra Suriye'de yapılan bir çalışmada ise koyunlardan yeni bir biyotip olan A17'yi identifiye edilmiştir (Rice ve ark., 2008). Son yıllarda DNA-DNA hibridizasyon ve 16s RNA sekansing, ribotiplendirme çalışmaları baz alınarak önceki A serotipleri (A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 ve A17) *M. haemolytica* olarak tekrar tanımlanırken, geri kalan A11 serotipi *M. glucosida* olarak isimlendirilmiş (Rice ve ark., 2008; Zecchinon ve ark., 2005; Winn ve ark.,2006) ve yeni bir cins altında toplanmıştır. Bu yeni *Mannheimia* cinsi, *M. haemolytica* ve *M. glucosida* türleri dışında *M. ruminalis*, *M. granulomatis* ve *M. varigena* olarak adlandırılan 3 yeni türü de kapsamaktadır. Bu yeni türler *Actinobacillus* cinsi ile (özellikle *A. lignieresii*) yakın akrabalık göstermektedir (Winn ve ark.,2006).

M. haemolytica; A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 ve A17 olmak üzere 12 kapsüler serotipe sahiptir (Rice ve ark., 2008). Bu serotiplerden A1 ve A2'nin tüm dünyada yaygın olduğu ve her ikisinin de sığır ve koyunların üst solunum yollarında kolonize olduğu belirtilmiştir. A6, A7, A9

ve A12 gibi diğer serotipler bildirilse de, sığır mannheimiozisinin en önemli etkeni A1 olarak kabul edilmektedir (Zecchinon ve ark., 2005). Sağlıklı sığırlar sıklıkla üst solunum kanalında her iki serotipi taşımasına rağmen, takip eden stres veya hasta hayvanlardan horizontal bulaşma ile A2'nin yerini öncelikli serotip olarak A1 alır (Rice ve ark., 2008). Davies ve ark. (2001) yaptıkları bir çalışmada A1 ve A6 serotipinin sığır pnömonik mannheimiozisinin hemen hemen bütün durumlarının sebebi olduğunu belirtmişlerdir. Yakın zamanda Amerika'da yapılan çalışmalar ile A6 serotipinin izole edilmiş serotiplerin %30'unu oluşturduğunu belgelenmiştir (Purdy ve ark., 1997; Al-Ghamdi ve ark., 2000). Bununla birlikte her serotipteki kapsül yapısından ayrı olarak, lipopolisakkarit yapıları ve dış membran proteinleri baz alındığında A1 ve A6 serotiplerinin son derece benzer olduğu görülmüştür (Rice ve ark., 2008; Zecchinon ve ark., 2005). A2 serotipinin ise koyunlarda pnömonik mannheimiozisin en yaygın etkeni olduğu, ancak, A5, A6 ve A7 serotiplerinin de prevalansının yüksek olduğu bildirilmiştir (Rice ve ark., 2008).

M. haemolytica sağlıklı sığırlarda kommensal bir mikroorganizma olarak nazofarinksde ve tonsillerde yaşar ve konakçısı ile simbiyotik ilişkisini sürdürür (Rice ve ark., 2008). Ancak sütten kesme, kötü hava koşulları, hayvan nakilleri, beslenme değişikliği, sürüye yeni katılımlar gibi stres yaratan durumlar esnasında bakteri üst solunum yollarında çoğalır (Rice ve ark., 2008; Sun ve ark., 1999). *M. haemolytica* infeksiyonlarının patogeneğinde viruslar (Parainfluenza virüs 3, Bovine herpes virüs 1, Bovine respiratory sinsityal virüs) ve diğer bazı bakterilerde (*P. multocida*, *Mycoplasma bovis*, *Arcanobacterium pyogenes*) rol oynar (Zecchinon ve ark., 2005; Winn ve ark., 2006). Bu faktörlerin tümü üst solunum yolu kanalı epitelyumunda bakterinin kolonize olmasını, nazofarinksden akciğerlere inmesini sağlar ve akciğerlerde bronko-alveolar pnömoniye sebep olur. Klinik olarak depresyon, yüksek ateş, nabızda artış, önemli derecede kilo kaybı, mukopurulent nazal akıntı ve öksürük gibi bulgular gözlemlenebilir (Zecchinon ve ark., 2005).

M. haemolytica, konak defansından kaçmasına ve kolonize olmasına olanak tanıyan ve hastalık patogeneğinde önemli rol oynayan bir çok virulens faktörüne sahiptir (Jeyaseelan ve ark., 2002; Stevens ve Czuprynski 1996). Bu faktörler *M. haemolytica*'nın çok sayıdaki ürününü ve komponentlerini kapsamaktadır (Rice ve ark., 2008). Adhezinler, kapsüler polisakkarit, dış membran proteinleri (OMP), lipopolisakkarit (LPS), nöraminidaz, lökotoxin (LKT), lipoproteinler, siyaloglikoproteaz, serotip-spesifik protein ve transferin-bağlayan proteinler bu faktörler arasında sayılabilir (Rice ve ark., 2008; Jeyaseelan ve ark., 2002; Zecchinon ve ark., 2005; Reggie ve ark., 2001).

M. haemolytica kapsüler polisakkariti (CPS), β 1-4 bağı ile bağlı *N*-asetilmannozaminüronik asit (ManNAcA) ve *N*-asetilmannozamin'in (ManNAc) oluşturduğu disakkaritin tekrarlamasından meydana gelir ve patogeneğinde farklı mekanizmalar ile önemli rol oynar (Reggie ve ark., 2001). Kapsüler polisakkarit *M. haemolytica*'nın sığır solunum sisteminde adhezyonunu ve kolonizasyonunu kolaylaştırır. Bununla birlikte hem nötrofillerin fagositik ve bakterisit aktivitesinin inhibisyonu, hem de komplement aracılı lizisin inhibisyonunda önemli rol oynayarak bakterinin ölmesini engelleyen bir virulens faktörüdür (Reggie ve ark., 2001; McKerral ve Reggie, 2002). Gatewood ve ark. (1994) kapsüler polisakkaritin antijenik özelliğini kültür şartlarında gösterildiğini ve konaktaki büyüme boyunca üretilen kapsüler polisakkaritin koruyucu immun cevabı uyardığını bildirmişlerdir.

Dış membran proteinleri *M. haemolytica*'nın immun cevaptan korunmasını sağlayan önemli yüzey antijenleridir. Deneysel enfeksiyonlarda *M. haemolytica*'nın dış membran proteinlerine karşı oluşan antikor cevabı, komplement aracılı ölüm ve Fc reseptör aracılı fagositoz ile orantılıdır (Ayalew ve ark.,2004). Pandher ve ark. (1998) proteaz muamelesi ve Western blotting tekniği ile 21 immunojenik dış membran proteinini tanımlamışlardır. *M. haemolytica* in-vivo ortamda akciğer dokusunda 32 kDa

büyükliğünde OmpA, 35 kDa büyüklüğünde PomB, 38 kDa büyüklüğünde yüzey lipoproteini ve demir bağlayıcı OMP'ler gibi dış membran proteinleri üretir. *M. haemolytica*'nın virulensinde OmpA'nın dış membran bütünlüğünü ve hücre şeklini koruma, konjugasyonda rol alma, serumun bakterisidal etkilerine karşı dirençte rol oynama gibi fonksiyonları olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Davies ve Lee, 2004; Reeks ve ark., 2005). Bu proteinin *Escherichia coli* OmpA ile benzer olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Mahasreshti ve ark., 1997). Bununla beraber enfeksiyona karşı dirençte 86, 66, 49 kDa OMP'lerin de etkili antikor yanıtı yarattığı gözlenmiştir (Diker ve ark., 1995). Ayrıca yapılan çalışmalarda, üç büyük demir bağlayıcı dış membran proteini (IROMPs) identifiye edilerek *M. haemolytica*'nın demir kısıtlı ortamlarda da kolayca ürediği bulunmuştur. Bu proteinlerden 77 kDa ağırlığındaki proteinin fonksiyonu tam olarak bilinmemekte, diğer iki demir bağlayıcı protein ise Tbp1 ve Tbp2 olarak tanımlanmaktadır. Bu demir bağlayıcı proteinler nötrofil fonksiyonları ve fagositozun inhibe edilmesi için etkili faktörlerdir (Jeyaseelan ve ark., 2002; Reggie, 2001).

M. haemolytica'da serotipe göre adezin –konak reseptör ilişkileri farklılık gösterebilir. Bu etkileşimlerin çoğu, fimbria veya dış membran proteinleri gibi spesifik organellerin ortaklığından meydana gelir. Bazı durumlarda ise konak hücre karbonhidratlarının spesifik olarak tanınmaları sırasında bu adezyon mekanizmaları aracılık yapar (Jaramillo ve ark., 2000), fakat moleküller aracılı konak adezyonu hakkında yeterli bilgi yoktur (Jeyaseelan ve ark., 2002) *M. haemolytica* en az 2 farklı tip fimbriaya sahiptir. Bunlardan biri 12 nm çapında sert yapılı diğeri ise 5 nm çapında esnek yapılıdır. Yapılan çalışmalarda büyük çaplı fimbria purufiye edilmiş ve bunun 35 kDa ağırlığında bir alt üniteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular virulent *M. haemolytica*'nın kolonizasyonunu sağlayan adezyon faktörlerine sahip olduğunu gösterir. *M. haemolytica* ayrıca adezin adı verilen 68 kDa ağırlığında, SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat/Poliakrilamid Jel Elektroforez) ile belirlenebilen, adezyonda görev alan bir proteine sahiptir. Adezin tavşan eritrositlerini ve sığır trakeal epitelyum hücrelerini aglutine

eder, fakat bu etki *N*-asetil-*D*-glukozamin veya seyrek olarak da *N*-asetil neuromik asit ile inhibe edilebilir (Jaramillo ve ark., 2000; Jeyaseelan ve ark., 2002; Reggie, 2001).

M. haemolytica'nın virulens faktörleri arasında nöraminidaz enzimi de vardır. Nöraminidaz, ekstraselüler, ısıyla değişen bir enzimdir. Bu enzim bakterinin sabit büyüme fazı boyunca maksimum olarak üretilir (Straus ve ark., 1998). Fakat nöraminidaz enzimi üretimi *M. haemolytica*'nın serotiplerine göre farklılık göstermektedir ve bazı serotipleri bu enzimi üretirken bazıları ise üretmemektedir (Straus ve ark., 1993, White ve ark., 1995). Straus ve ark. (1998) tarafından yapılan çalışmada ise *M. haemolytica* A1 serotipinin nöraminidaz enziminin moleküler ağırlık, antijenik özellik ve substrat spesifitesi bakımından diğer enzimi üreten serotipler tarafından salgılanan nöraminidaz enzimleri ile benzer özellik gösterdiği ortaya konulmuştur. Nöraminidaz, *Streptococcus pneumoniae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Vibrio cholerae* gibi bakterilerde de virulens faktörü olarak patogeneizde önemli rol oynar (Straus ve ark., 1993; Straus ve ark., 1998).

Virulens faktör olarak nöraminidaz etkisinin tam mekanizması henüz açıklanamamıştır. Ancak bu aktivitenin muhtemel mekanizmalarından biri, tükürük glikoproteinlerinden sialik asit yapısını bağlaması ve ağ yapısını azaltması sonucu bakterinin hücre yüzeyine daha yakın olması ve bakterinin hayatta kalmasıdır (Straus ve ark., 1998; Jeyaseelan ve ark., 2002). Diğer bir mekanizma ise solunum yolu mukusunun vizikositesini azaltması ve böylece mukosiliyal örtünün etkinliğinin azalması sonucu bakterilerin solunum epitelyumunun daha derinine yerleşim gösterebilmesidir (Jeyaseelan ve ark., 2002).

M. haemolytica'nın diğer bir virulens faktörü olan lipopolisakkarid (LPS) in vitro ortamlarda klasik endotoksin etkisi gösterir (Diker ve ark., 1995). LPS Gram negatif bakterilerde hücre duvarında önemli bir

komponentdir (Jeyaseelan ve ark., 2002). LPS molekülü genellikle 3 farklı bölgeden meydana gelir. Bu bölgelerden ilki, oligosakkarid ünitelerinin tekrarından oluşmuş O-spesifik polisakkarid zinciridir. İkinci bölge düşük moleküler ağırlığa sahip çekirdek oligosakkarid bölge, üçüncü bölge ise endotoksik aktivite içeren lipid A kısmıdır. LPS kompleksi *M. haemolytica* serotiplerine göre değişiklik gösterebilir ve genellikle bakterinin ağırlığının %10-25'i LPS kompleksinden oluşur (Lacroix ve ark., 1993; Leite ve ark., 2003,) Lacroix ve ark. (1993) *M. haemolytica* LPS'lerinin yapısal ve antijenik özelliklerini inceledikleri çalışmalarında, serotip 2 ve 8 suşlarının rough tip LPS'ye yani sadece çekirdek oligosakkarit ve lipid-A bölgelerinden oluşan LPS'ye, diğer 14 serotipin ise smooth tip LPS'ye yani bütün bölgeleri içeren LPS'ye sahip olduklarını belirlemişlerdir. Lipid A kısmının konak defans mekanizmalarındaki aktivitesi tam olarak açıklanamamasına rağmen, asıl immun yanıtın O-polisakkarid bölgesine karşı olduğu bilinmektedir (Lacroix ve ark., 1993).

LPS hem hidrofobik hemde hidrofilik bir moleküldür ve lökosit fonksiyonlarını değiştirebilir, sığır alveolar makrofajlarını yangısal sitokinleri salgılaması için uyarabilir (Malazdrewich ve ark., 2004). Ayrıca in vitro ortamlarda sığır endotel hücreleri için sitotoksiktir ve bu toksik etkileri kapsayan kompleks mekanizmalar ile solunum sistemi endotelyumu patolojisine katkıda bulunur (Jeyaseelan ve ark., 2002; Leite ve ark., 2003; Li ve Clinkenbeard, 1999). Ayrıca uyarılmış sığır lökositlerini, TNF- α , IL-1 β , nitrik oksit, interlökin-8 (IL-8), histamin ve prostoglandin E2 gibi yangısal araçlar sentezlemesi ve serbest bırakması için uyarır, bu da ciddi solunum sistemi hasarına yol açabilir (Yoo ve ark., 1995; Leite ve ark., 2003; Lafleur ve ark., 2001). McClenahan ve ark. (2008) hem LPS hem de LKT 'nin sığır mikrovasküler endotelyal ve alveolar epitelyum hücrelerinde permeabilite, morfoloji ve apoptozis seviyelerinde etkilerini inceledikleri çalışmalarında LPS'nin endotelyal hücrelerde apoptotik etkilere sahip olduğunu, fakat epitelyum hücrelerinde bu etkinin görülmediğini bildirmişlerdir. Yakın

zamanlarda yapılan in vitro çalışmalarda LPS kompleksinin ayrıca LKT'nin biyolojik etkilerini arttırdığı görülmüştür (Jeyaseelan ve ark., 2002).

Yapılan çalışmalar LPS'ye maruz kalan çeşitli hücrelerde (özellikle sığır ve insan endotelyal hücrelerinde) ön-yangısal ve hasarı indükleyen etkiler görüldüğünü gösterir. LPS, bu hücrelerde Toll-like reseptör 4 (TLR-4) sinyal yolunu aktive eder. Aktive olan TLR-4 ise apoptotik sinyalizasyonu başlatır ve böylece hücreler apoptozis geçirir (Cates ve ark., 2008; McClenahan ve ark., 2008).

M. haemolytica'nın en önemli virulens faktörü, patogeneğinde çok önemli olduğuna inanılan ruminant spesifik lökotoksindir (LKT) (Rice ve ark., 2008; Jeyaseelan ve ark., 2002; Zecchinon ve ark., 2005). LKT ısıya duyarlı, oksijene ve pH değişimlerine dayanıklı ve suda çözünebilen bir proteindir. İn vitro üremenin logaritmik fazı boyunca bakterinin bütün serotipleri tarafından sentezlenir ve salgılanır. Ancak LKT miktarı ve biyolojik aktivite yönünden serotipler arasında farklılıklar vardır. (Rice ve ark., 2008; Jeyaseelan ve ark., 2002). Ayrıca 104 kDa ağırlığında, por oluşturan RTX (repeats-in-toxin) toksin ailesinin bir üyesi olan kuvvetli kalsiyum bağımlı sitolitik bir toksindir (Stevens ve Czuprynski 1996; Thumbikat ve ark. 2005).

Por oluşturan RTX toksinler, çeşitli hayvan ve insanlarda enfeksiyon oluşturan Gram negatif bakteriler tarafından üretilirler. Bu bakteriler ve toksinlerine *M. haemolytica*'nın LKT'i dışında, *Actinobacillus pleuropneumoniae* sitotoksinleri, *Bordetella pertussis* adenilat hemolizini ve *E. coli* α -hemolizini örnek verilebilir. Strathdee ve Lo (1987) *M. haemolytica* LKT'sinin *E. coli* α -hemolizini ile genetik olarak çok benzediğini bildirmiştir. Bu toksin ailesinin üyeleri büyük ölçüde değişken etki mekanizmalarına ve konak spesifitelerine sahiptir (Thumbikat ve ark. 2005). Diğer RTX toksinler gibi LKT'nin de yüksek konsantrasyonlarda hedef hücrelerin plazma membranlarında transmembran porlarının oluşumuna etki ederek onkozis olarak adlandırılan kolloid-osmotik hücre lizisine neden olduğu düşünülür.

Onkozise ek olarak, bu toksin bazı RTX toksinleri gibi düşük konsantrasyonlarda hedef hücrelerde apoptozise neden olur (Sun ve ark., 1999).

LKT, aktivasyonu, sentezi ve salgılanması için bakteriyel kromozomda polisistronik operon bölgesinde 4 gen (*LktC*, *LktA*, *LktB* ve *LktD*) ile kodlanır (Rice ve ark., 2008; Jeyaseelan ve ark., 2002; Zecchinon ve ark., 2005). *LktC*, *LktA*, *LktB* ve *LktD* tarafından kodlanan polipeptidler sırasıyla 165, 953, 708 ve 478 aminoasit uzunluğunda ve 20, 102, 80 ve 55 kDa moleküler ağırlığındadır. A geni (*LktA*) yapısal toksini kodlar. C geninin ürünleri, toksin aktivasyonu için gereklidir. B ve D genlerinin ürünleri ise toksin salgılanmasında kullanılır. *Lkt* operonunun promotor aktivitesi bakteriyel üremenin erken logaritmik fazında pik düzeye ulaşır ve logaritmik fazın ortasında ise düzgün bir şekilde azalmaya başlar. Böylece LKT proteini bakteriyel üremenin logaritmik fazında maksimum düzeyde üretilir. Yani bakteriyel üreme ve *Lkt* operonunun ekspresyonu birlikte düzenlenir. Demir (Fe) eksikliği, sıcaklık gibi çevresel faktörler bu düzenlemede *Lkt* promoterlerinin aktivitesi için gereklilik gösterirler (Rice ve ark., 2008; Jeyaseelan ve ark., 2002; Zecchinon ve ark., 2005).

LKT, önce inaktif bir formda sentezlenir ve *LktC* geninin yağ asidi açılmasıyla aktif hale geçer. Bu aktivasyon aşamasında toksin etkisini kaldırır, proteinin hidrofobisitesi artırılır. Bu açılma *Lkt*'nin biyolojik aktivitesi için gerekli olup, toksinin hücre dışına çıkması için yeterli değildir. *LktB* ve *D* tarafından kodlanan ürünler hücre dışı ortama, açılmış LKT'nin geçişini sağlar (Rice ve ark., 2008; Jeyaseelan ve ark., 2002; Zecchinon ve ark., 2005). Fedorova ve Highlander (1997) antijenik ön-LKT salgılayan fakat lökotosik veya hemolitik olmayan, *LktC* geninin, ön-LKT'nin aktivasyonu için gerekli olduğu onaylanan bir mutant suş meydana getirmişlerdir. Sonrasında, Highlander ve ark. (2000) bu suşun sığır modelinde virulensi zayıflatılmış inaktif LKT salgıladığını göstermişlerdir.

Lkt genlerinin sekans analizi ve polimorfizm çalışmaları, farklı serotiplerin farklı LKT tipleri ürettiğini göstermiştir. Serotip A1, A5, A6, A8, A9 ve A12 çok benzer LKT'lere (LktA1.1, LktA1.2 ve LktA1.3) sahiptir, ancak serotip A2 izolatları dört LKT tipinden (LktA2, LktA3, LktA8 ve LktA10) herhangi birini eksprese edebilir. LKT aynı serotiplerin sığır ve koyun izolatları arasında da değişebilir (Rice ve ark., 2008).

M. haemolytica LKT sığır pnömonik mannheimiozisinde akciğere ciddi zararlar veren ve klinik belirtilere neden olan primer bir faktördür. Deneysel çalışmalarda hastalığın şiddeti ve LKT miktarı arasında bir orantı olduğu görülmüştür (Jeyaseelan ve ark., 2002; Preez ve ark., 2008). LKT, bakterinin fagositozdan kaçarak yaşamasında en önemli rolü oynar. LKT sığır alveolar makrofajları ve akciğer nötrofillerinde dejenerasyon oluşturur (Rice ve ark., 2008). LKT'nin kan pulcuklarını lize ettiği ve bunun trombus oluşumu ve fibrin eksudasyonu yoluyla lezyonlara katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Diker ve ark., 1995). Aynı zamanda LKT'nin sığır mannheimiozisinde enfeksiyonun şiddetini arttırdığı da görülmüştür (Jeyaseelan ve ark., 2002).

Çoğu RTX toksini, geniş bir aralıkta vertebralıların pek çok hücre tipinde lizise neden olur ve az çok tür spesifitesi gösterir. Diğer yandan *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ve *M. haemolytica* tarafından üretilen sitolizinler, lökositler üzerine primer etki gösteren lökotoksinler olarak bilinirler ve bu lökotoksinler hayvan türüne spesifiktir. *M. haemolytica* LKT bir ruminant lökositleri ve trombositlerine etki eden ruminant spesifik toksindir, Bu toksinin hücre tipi ve tür spesifitesi kendi hedef hücrelerinin spesifik reseptörleri ile ilişkilidir. Pek çok çalışmada *M. haemolytica* LKT'nin duyarlı hedef hücrelere bir yüzey reseptörü aracılığı ile bağlanabildiği bildirilmiştir (Jeyaseelan ve ark., 2002) ve LKT duyarlılığının, antijen 1 ile birleşmiş lenfosit fonksiyonuna (LFA-1) (CD18/CD11a) bağlı olduğunu ortaya çıkarılmıştır. LFA-1 ağırlıklı olarak lenfositler, monositler ve nötrofiller üzerinde bulunur. LFA-1'e bağlı LKT toksinin hücre membranı içine geçişini kolaylaştırır. Bu olay immun hücrelerin eliminasyonu ile sonuçlanır

(Srikumaran ve ark., 2008; Zychlinsky ve Sansonetti, 1997; Jayaseelan ve ark., 2000). Akciğerlerde deneysel olarak oluşturulmuş mannheimiozisde, immunohistokimyasal analiz kullanarak Whiteley ve ark. (1990)' nın yaptıkları çalışmada, LKT'nin seçici olarak alveolar lökositlere bağladığı ve dejeneratif değişikliklere neden olduğu, bu değişimin alveolar epitelyum ve endotelial hücrelerde olmadığı görülmüştür. Flowsitometrik temelli bağlanma testlerinde ise LKT'nin sığır lökositlerine hücre yüzey proteini aracılığıyla bağlandığı, ancak domuz lökositlerinde bu bağlanmanın görülmediği belirtilmiştir. Sun ve ark. (1999) yaptıkları bir çalışmada LKT'nin sadece ruminant lökositlerine bağlanmadığını, aynı zamanda karnivor, domuz ve at lökositlerine de bağlandığını, fakat sadece sığır lökositlerinde hücre içi kalsiyum akışını bozduğunu göstermişlerdir.

Enfeksiyon sırasında sığır hücreleri üzerinde LKT'nin etkileri doz bağımlıdır. Çok düşük konsantrasyonlarda, toksin hedef hücrelerin degranülasyonunu tetikler. LKT konsantrasyonu arttıkça, hedef hücreler apoptozise gitmek için uyarılır. Bu uyarım alveolar makrofajların aktive edilmesiyle yangısal sitokinlerin salgılanması, bunların da etkisiyle nötrofillerin aktivasyonu ve sonrasında nitrik oksit, serbest oksijen radikalleri, proteazların salgılanması gibi durumları kapsar (Jeyaseelan ve ark., 2002; Thumbikat ve ark. 2005). Sonuç olarak hücrelerde morfolojik, biyokimyasal ve moleküler değişimler meydana gelir ve hücre apoptozis geçirir (Thumbikat ve ark. 2005). Yüksek LKT konsantrasyonunda, hedef hücrelerde plazma membranında por benzeri yapılar oluşur ve membran dışına K^+ ve membran içine Ca^{+2} akımı, koloidal ozmotik artış ve sonuç olarak onkotik hücre lizisi olarak adlandırılan onkozis meydana gelir (Rice ve ark., 2008). LKT, alveolar makrofajları ve nötrofilleri etkileyerek proliferasyonu engeller ve bu hücrelerin antibakteriyel etkilerini ortadan kaldırır, böylece daha uzun süre bakterinin hayatta kalması sağlanmış olur (Jeyaseelan ve ark., 2002).

LKT ve LPS'nin etkilerini birbirinden ayırmak kolay değildir. Hem beraber kompleks oluşturarak hem de ayrı ayrı çeşitli sinyal yollarını uyarıp farklı etkilere sebep olabilirler (Zecchinon ve ark., 2005).

Gelişmiş organizmaların hücreleri genetik olarak belirlenmiş programlı intihar yöntemini içerir. Apoptozis adı verilen biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler ile hücre kendi kendini yok eder (Muller ve Rudel, 2001). İskoçya'daki Aberdeen Üniversitesinde Alastair Currie, 1970'lerin başında ilk olarak, tek hücre ölümünü karsinogen maddeler uygulanan ratların adrenal kortekslerinde bulmuştur. John Kerr Avustralya'da 1971'de, toksin uygulanan hayvanların ciğerlerinde bu "tek hücre ölümü" olgusunu görmüş ve buna "nekrozis azalması" adını vermiştir. Currie ve Kerr benzer özellikteki yapısal değişim sürecinin, normal gelişim, tetragenezis, neoplazi, atrofi sırasında sağlıklı dokularda da meydana geldiğini göstermiştir. Daha sonra, bu tek hücre ölümüne apoptozis adı verilmiş ve bu içerik 1972'de yayımlanmıştır (Perl ve ark, 2005).

Apoptozis, aktif, enerji bağımlı, iyi tanımlanmış bir süreç olan programlanmış hücre ölümü olarak da bilinir (Perl ve ark, 2005). Bu morfolojik olay tek bir hücrede, nükleer ve sitoplazmik yoğunlaşma, azalmış mitokondrial membran potansiyeli, hücre büzülmesi, sitoplazmik azalma, zeiozis (dinamik plazma membran kabarması), DNA fragmentasyonu, ve membranla kaplı hücresel parçalanma (apoptotik parçacıklar) ile karakterizedir (Dockrell,2001; Fink ve Cookson, 2005; Menaker ve Jones, 2003; Öniz, 2004; Perl ve ark, 2005; Tomatır, 2003). Apoptotik parçacıklar, fagositik hücrelerin içine alınır ve fagozomlar içinde bozulurlar (Gao ve Kwaik, 2001).

Programlı hücre ölümü sırasında DNA parçalara ayrılır. Apoptotik hücrelerdeki DNA polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ile incelendiğinde yaklaşık 200 baz çiftlik bir yapı gözlenir. Apoptozisin belirlenmesindeki diğer bir yöntem ise terminal deoxynucleotidyl transferase

nick end labeling (TUNEL) denilen bir metottur. Bu matodla kırılmış DNA parçaları görünür hale getirilir. Apoptozis, ayrıca çeşitli boyama yöntemleri ve ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) gibi immunolojik yöntemlerle de belirlenebilir (Leite ve ark.,1999).

İnfeksiyonlarda konak hücre ölümünün rolü oldukça önemlidir (Gao ve Kwaik, 2001). Birçok patojenik mikroorganizma hem toksik ürünler üreterek hem de konak hücreleri infekte ederek ökaryotik hücre ölümüne sebep olur. Hücre ölüm mekanizması immun cevabı etkilemesi ve yangının şekillenmesi için oldukça önemlidir (Fink ve Cookson, 2005). Bakteriler, çeşitli stratejilerden faydalanarak konak hücrenin apoptotik sinyalizasyonunu ayarlayabilir ve böylece hastalık patogenezinde rol alırlar (Menaker ve Jones, 2003). Apoptozisi aktive etmek için bakteriler tarafından kullanılan stratejiler, normal konak hücre defansını bozmak için gerekli olabilir. Yani immun hücrelerin apoptozisi, infekte hücrelerin yaşama yeteneklerini iyileştirmek ve bakterilere konak immun cevaplarının etkinliğini azaltmaları ve bundan kaçmaları için imkân tanır (Fink ve Cookson, 2005; Menaker ve Jones, 2003).

Apoptozisin aracısı olarak birçok patojen tanımlanmaktadır. Bu patojenler dokuları infekte eden Gram pozitif veya Gram negatif bakterilerle beraber Mycobacterileri de kapsamaktadır. Programlı hücre ölümünü kapsayan en az üç patojenik strateji vardır (Zychlinsky ve Sansonetti, 1997a). Bunlar;

- Hücreleri hasara uğratmak için apoptozisin aktivasyonu
- Yangının tetiklenmesi için apoptozis aktivasyonu
- Konak hücre apoptozisinin inhibisyonu

Corynebacterium diphtheriae, *Pseudomonas* spp, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, ve *Bacillus anthracis* gibi ekzotoksin üreten

bakteriler, makrofajlar tarafından sindirilmeden veya hasara uğratılmadan önce makrofajları öldürmede apoptozisi kullanırlar (Zychlinsky ve Sansonetti, 1997a). *M. haemolytica* da ürettiği LKT sayesinde makrofaj fagositozundan kurtulur (Thumbikat ve ark. 2005). Bakterilerin konak hücre ölümünde faydalandığı diğer bir durum ise epitelyal hücrelerin apoptozisini indüklemeleridir. *Shigella* ve *Salmonella* infeksiyonlarında apoptozis yangıyı tetiklemek için kullanılır (Zychlinsky ve Sansonetti, 1997b). *Chlamydia*, *Rickettsia* gibi bazı hücre içi patojenler, konak hücre apoptozisini engeller. Bu, proliferasyon sırasında infekte hücrelerin ölümünün engellenmesi ile bakteriye çoğalması için fırsat tanır (Gao ve Kwaik, 2000).

Patojenler, konak hücre ölüm yolunun anahtar komponentleri ve birbirini etkileyen virulens belirleyicileri ile donatılır. Bu virulens belirleyicileri ise bazı yollar ile hücre ölümünü tetikler.

Patojenler, ürettikleri por oluşturan toksinler ile hücre membranında porlara neden olurlar ve konak hücrelerde apoptozisi tetiklerler (Gao ve Kwaik, 2000). Bu toksinler, spesifik hücre yüzey reseptörlerine bağlanır (Zychlinsky ve Sansonetti, 1997b). Ayrıca iyonların serbest bırakılmasını kolaylaştıran ve karakteristik DNA fragmentasyonu ile sonuçlanan küçük porlara neden olurlar (Gao ve Kwaik, 2000). Ya da Ca^{2+} 'ye açık büyük porlar oluşturabilir ve bu olay kaspasların aktivasyonuna yol açabilir (Jones ve ark., 2000; Zychlinsky ve Sansonetti, 1997b). Bu toksinler, mitokondriyal membranın içine eklenip apoptozisin efektör molekülleri olan kaspasların aktivasyonuna yol açan sitokrom c'nin serbest bırakılmasına neden olurlar (Jones ve ark., 2000). Ek olarak, LFA-1 (antijen 1 ile birleşmiş lenfosit fonksiyonu) ise bu toksinlerin hücre membranına girişini kolaylaştırır (Zychlinsky ve Sansonetti, 1997a).

Apoptotik por biçimlendiricilerinin en az 3 farklı tipi vardır. Bunlar; amfifilik toksinler (*Staphylococcus aureus* 'un α - toksini gibi, ki bu iyon

geçiren por yaratarak hücre membranı içine direkt sokulur.), tiyol aktif toksinler (*Listeria monocytogenes*'in listeriosin O toksini gibi), por oluşturan toksinlerin RTX (repeats-in-toxin) ailesidir. Por oluşturan toksinlerin RTX ailesi içerisinde *A. pleuropneumoniae* ve *M. haemolytica* tarafından sentezlenen sitotoksinler de bulunur. Bu sitotoksinler, sığır lökositlerinde hücre ölümüne sebep olurlar (Weinrauch ve Zychlinsky, 1999).

Patojenler, ürettikleri A-B toksinler ile konak hücrelerdeki protein sentezini inhibe ederek konak hücrenin ölümüne sebep olurlar (Lazebnik, 2001; Weinrauch ve Zychlinsky, 1999). Bunlar A ve B alt bölümlerine sahiptirler. B alt üniteleri konak hücrelerin reseptörlerine bağlanmaya aracılık eder. A alt üniteleri ise enzimatik aktiviteye sahiptir (Zychlinsky ve Sansonetti, 1997a). Bazı bakteriyel A-B toksinlerinde A alt bölgesi ADP-ribozil aktivitesine sahiptir. Bu aktivite ile protein sentezi için gerekli olan elengasyon faktörü 2 (EF-2) inaktive edilir ve konak hücre öldürülür (Stevens ve Czuprynski 1996; Zychlinsky ve Sansonetti, 1997a). Bazılarında ise, A alt bölgesi N-glikosidaz aktivitesine sahiptir. Bu aktivite konak hücre ribozom fonksiyonlarını bozarak protein sentezini inhibe eder. Örneğin; *C. diphtheria*'nın difteri toksini (Dtx), *Pseudomonas* ekzotoksin A ve Shiga ve Shiga benzeri toksinler bu grup içindedir (Zychlinsky ve Sansonetti, 1997a).

Bazı Gram negatif patojenler (*Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp. gibi), tip-III salgılama sistemi olarak adlandırılan protein salgılama yolunu konak hücrelerde apoptozisin indüksiyonu için kullanırlar. Bu proteinler konak hücre sinyal transdüksiyon yollarını değiştirmek için konak hücre komponentleri ile etkileşirler (Weinrauch ve Zychlinsky, 1999). Bazı bakterilerde, bir plazmidin kodladığı proteinler Tip-III salgılama sistemi ile konak hücre sitoplâzmasına bırakılır. Bu proteinler nükleer faktör (NF) kB'nin aktivasyonunu önler. Sonuç olarak hücreler apoptozis geçirir (Lazebnik, 2001).

Süperantijenlerin hücre ölümü sinyalizasyonu hala karışıktır. Süperantijenler, antijen sunan hücreler üzerindeki MHC (major histocompatibility complex) sınıf-II molekülleri ve T hücre reseptörlerinin spesifik V β bölgeleri ile eş zamanlı olarak etkileşir. Bu etkileşim T hücrelerini çoğaltmak ve gamma interferon gibi sitokin üretmek için uyarır. Genişleyen T hücre popülasyonu sonunda apoptozis ile tüketilir. Süper antijenler *S. aureus* ve *Streptococcus pyogenes*'in ürettiği ekzotoksinleri içerir (Zychlinsky ve Sansonetti, 1997a).

Bu etki yolları çeşitli bakterilere göre farklılık gösterir. Bakteri kendi çıkarına göre farklı yollar seçebilir veya bu yolların birkaçını beraber kullanabilir (Zychlinsky ve Sansonetti, 1997b). Çeşitli çalışmalar, Rho ailesi proteinlerinin bakteriyel toksinler için substratlar olduğunu ve bu proteinlerin apoptozisi indüklediğini göstermiştir (Atapattu ve Czuprynski, 2005).

Bu çalışmada, sığır epitel hücrelerinde, *M. haemolytica* ve *M. haemolytica* LKT uyarımlı apoptozisin belirlenmesi ile sığır mannheimiozisinin patogenezisinde epitel hücre apoptozisinin bir rolünün olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. *Mannheimia haemolytica* suşu

Sığır orijinli *M. haemolytica* A1 suşu Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden sağlandı. Ayrıca Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda bulunan *M. haemolytica* A1 suşu da çalışma kapsamına alındı. Suşların tümü, -20°C ve -80°C'de uygun besiyerlerinde saklandı. Ayrıca bu suşların PCR ile Lkt A genlerine bakılarak kontrolleri yapıldı. Kontrolü yapılan suşlardan, Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden sağlanan sığır orijinli *M. haemolytica* A1 suşu, çalışma suşu olarak seçilerek kullanıldı.

2.2. Epitel Hücreleri

Bu çalışmada sığır nazal turbinata epitel hücreleri sığır orijinli *M. haemolytica*, LKT ve kaynatılmış tüm hücre aracılı apoptozis için hedef hücre olarak kullanıldı.

2.3. Alveolar Makrofajlar

Bronkoalveolar makrofajlar *M. haemolytica*, LKT ve kaynatılmış tüm hücre aracılı apoptozis için hücre pozitif kontrolü olarak kullanıldı.

2.4. Besiyerleri

2.4.1. Colombia Blood Agar Base NO.2 (CBA)

M. haemolytica suşunun üretimi amacıyla genel besiyeri olarak CBA (Difco, 0793–17–2) kullanıldı. Besiyeri 39 g / 1000 ml olacak şekilde hazırlanarak ve pH'ı 7.3'e ayarlandı ve 121°C'de 15 dk sterilize edildi. Besiyeri sıcaklığı 45–50°C'ye gelince içerisine %5 oranında koyun kanı eklendi. Etüvde 24 saat inkübasyona bırakılarak kontaminasyon kontrolü yapıldı.

2.4.2. %0.5 Maya Ekstraktlı Brain Heart Infusion Broth (BHI)

M. haemolytica lökotoxin üretimi için genel besiyeri olarak %0.5 maya ekstraktı (Difco, 212750) içeren BHI Broth (Oxoid, CM0225) kullanıldı. Besiyeri 37 g brain heart broth ve 5 g maya ekstraktı 1000 ml distile su içinde çözülerek hazırlandı ve pH'ı 7.0'a ayarlandı ve 121°C'de 15 dk sterilize edildi.

2.4.3. RPMI–1640 Medium

LKT üretiminde, kaynamış tüm hücre hazırlanmasında, *M. haemolytica* saf kültür, LKT ve kaynamış tüm hücre sulandırılmalarının hazırlanmasında, alveolar makrofajların izolasyonunda RPMI–1640 Medium (HyQ, SH30255.01) kullanıldı.

2.4.4. Diğer Besiyerleri

M. haemolytica suşlarının pasajlanmasında Tryptic Soy Broth (TSB, Difco, 211825), suşlarının muhafaza edilmesi amacıyla %15 oranında gliserin (Merck, 4094) ilave edilen Tryptic Soy Broth (TSB, Difco, 211825), hücre

kültürü pasajlarında Dulbecco's Modifiye Eagle Minimal Essential Medium F12 (DMEM-F12, Biochrom, F4815) ve Fötal Dana Serum (Biochrom, S0313) kullanıldı.

2.5. Solüsyonlar

2.5.1. Phosphate Buffered Saline (PBS)

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g

800 ml distile su içerisinde çözüldü, pH'ı 7.4'e ayarlandı ve toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edildi.

2.5.2. %4'lük Paraformaldehit Solüsyonu

Deneyisel inokülasyon sonrasında, turbinata epitel hücrelerinin ve makrofajların fikse edilmesi için %4'lük Paraformaldehit Solüsyonu kullanıldı. 4 g paraformaldehit (Merck, 4005) tartıldı, üzerine PBS eklendi ve 100 ml'ye tamamlandı. Kapalı şişe içinde su banyosunda 65°C'de 2 saat ısıtılarak çözüldü. 4°C'de 2 haftadan fazla olmamak koşulu ile kullanılabileceği kadar saklandı.

2.5.3. %0.2'lik Triton X-100 Solüsyonu

Turbinata epitel hücrelerinin ve makrofajların permeabilize edilmesi için %0.2'lik Triton X-100 Solüsyonu (Sigma, Aldrich) kullanıldı. Triton X-100 solüsyonu %0.2'ye dilüe edilerek kullanıldı.

2.5.4. Denatürasyon Solüsyonu

Turbinata epitel hücreleri ve lökositlerden mRNA ekstraksiyonunda denatürasyon solüsyonu kullanıldı. 3 M %10'luk N-lauril sarcosin'den 0.3 g alındı, 3 ml distile suda çözüldü. Çözeltiden 2.64 ml bir şişe içine alındı. 0.75 M Na-citrat dihydrate'dan 0.45 g alındı ve 2 ml distile suda çözüldü. Çözeltiden 1.76 ml alınarak şişe içine eklendi. 25 g Na-Guanidine thiosionat 29.3 ml distile su içinde çözüldü ve çözelti şişe içine eklendi. Karışım otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edildi. Ardından karışım üzerine 360 µl merkaptotanol eklendi ve solüsyon denatürasyonda kullanıldı.

2.6. Lökotoksin A Geni için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

M. haemolytica suşlarının kontrolü amacıyla uygulanan PCR metodunda oligonükleotid primerler, LktA geninin, lökotoksin RTX domeinine spesifik olan 1,145 bp'lik fragmentini amplifiye eden primer çifti kullanıldı Bu primer çiftinin baz formülasyonu aşağıdaki gibidir (Fisher ve ark. 1999);

Forward primer: 5'- TGTGGATGCGTTTGAAGAAGG-3'

Reverse primer: 5'-ACTTGCTTTGAGGTGATCCG-3'

M. haemolytica suşlarının PCR'ı iki aşamada gerçekleştirildi.

2.6.1. Bakteriyel Genomik DNA Ekstraksiyonu

Bakteriyel genomik DNA izolasyonu Fermentas Genomik DNA Purifikasyon kiti (MBI Fermentas, Lithuania) kullanılarak kit protokolüne uygun şekilde yapıldı. Buna göre aşağıdaki adımlar uygulandı.

- TSB (Tryptic Soy Broth)'de 24 saat bekletilmiş bakteri kültürü 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant döküldü, üzerine 200 µl steril distile su eklendi ve vortekslendi.
- 200 µl örnek 400 µl lizis solüsyonu ile karıştırılarak 65°C'de 5 dk inkube edildi.
- 600 µl kloroform eklenerek karıştırıldı ve 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi.
- 720 µl steril distile su, 80 µl 10x konsantre solüsyonu ile karıştırılarak presipitasyon solüsyonu hazırlandı.
- Santrifüj sonrası tüpün üst kısmındaki DNA içeren sıvı faz yeni bir tüpe alındı ve üzerine 800 µl presipitasyon solüsyonu eklendi. Oda sıcaklığında 1–2 dk karıştırıldı. 10.000 rpm'de 2 dk. santrifüj edildi.
- Süpernatant tamamıyla alındı. DNA peletine 100 µl 1.2M NaCl solüsyonu eklenip vortekslenerek DNA peletinin iyice çözünmesi sağlandı.
- 300 µl soğuk etanol eklenerek DNA'nın presipite olması için -20°C'de 10 dk bekletildi. 10.000 rpm'de 3 dk. santrifüj edildi. Üst kısımdaki etanol dökülerek pelet %70'lik soğuk etanol ile yıkandı. DNA 100 µl distile suda iyice karıştırılarak çözündürüldü.

Ekstraksiyonu yapılan DNA örnekleri amplifikasyon işlemleri yapılanlara kadar -20°C'de template DNA olarak kullanılmak üzere saklandı.

2.6.2. PCR Amplifikasyon Koşulları

PCR'da Fisher ve ark. (1999) tarafından bildirilen yöntem modifiye edilerek kullanıldı. PCR'da amplifikasyonda kullanılan bileşenler aşağıda verildi.

Distile su	39.1 µl
10xPCR buffer	5 µl
MgCl ₂	3 µl
DNTP mix	0.8 µl
Primer 1	0.4 µl
Primer 2	0.4 µl
Taq DNA polimeraz	0.3 µl

PCR'da kullanılan örnek sayısına göre hazırlanan reaksiyon karışımı DNase ve RNase-free PCR tüplerine dağıtıldı. Üzerine 0.5 µl template DNA'lar eklendi. Tüpler 50°C'ye ısıtılmış thermal cyclers'a konuldu. PCR toplam 30 siklus uygulandı. Her sikluskı sıcaklıklar ve süreleri aşağıdaki gibidir.

94°C	1 dk
55°C	1 dk
72°C	1 dk

PCR ürünleri göz başına 10 µl örnek hacminde, %1.5'lik agaroz jelde 120 voltta 45 dk elektroforez işlemine tabi tutuldu. Elektroforez sonuçları 1,145 bp bant büyüklüğüne göre değerlendirildi.

2.7. Hücre Kültürü

2.7.1. Epitel Hücre İzolasyonu ve Hücre Kültürü Hazırlanması

Mezbahadan elde edilen uygun yaştaki sığır fetusundan alınan türbin kıkırdak dokusundan nazal turbinata epitel hücreleri elde edildi ve kültürleri hazırlandı. Sığır fetüsünün 125 ile 140 günlük arasında olması tercih edildiğinden yaş hesabı aşağıda belirtilen formüle göre hesaplandı.

Fetüsün yaşı (gün olarak) = $2,5 \times (\text{oksipital eklem ve sakral eklem arasındaki mesafe cm olarak}) + 21$

Yaşı hesaplanan uygun fetüsün nasal septumu steril makas ile açıldıktan sonra türbin kıkırdağı steril bisturi ve pens yardımıyla ayrıldı ve antibiyotikli (100 u/ml penisilin G ve 50 µg/ml streptomisin ihtiva eden) PBS (Phosphate Buffered Saline) içine alındı ve +4°C'de 1 saat bekletildi. Çıkarılan kıkırdak doku 2-8 mm³ ebatında küçültüldü ve petri kaplarında fetal dana serumu (Biocrom, Germany) ilave edilerek explant outgrowth metodu kullanılarak yapıştırıldı. Üzerine epitel growth faktör (EGF) içeren Dulbecco's modifiye Eagle minimal essential medium F12 (DMEM-F12, Biocrom, Germany) eklendi ve 24-48 saat 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. Monolayer şekilde üreyen hücreler tripsinizasyon metodu ile 75 veya 25 cm²'lik flasklara pasajlandı. Daha sonra amaca göre 24 gözlü ya da 96 gözlü hücre kültür pleytlerine geçildi.

2.7.2. Alveolar Makrofaj İzolasyonu

Mezbahada kesilen 4 genç sığırın lezyonsuz akciğerleri alındı. Sonrasında bu akciğerlerin alveollerine 1 l PBS verildi ve akciğerden lavaj sıvısı toplandı. Toplanan sıvı, 3000 rpm'de 10-15 dk santrifüj edildi. Üsteki süpernatant atılarak, üzerine atılan sıvı kadar PBS eklenip, vortekslendi. Bu işlem 2 defa

daha tekrarlandı. Sonrasında hücre peletinin üzerine lökositleri lize etmek için steril distile su eklendi ve 3000 rpm'de 10–15 dk santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Hücreler RPMI-1640'da süspanse edildi. Ayrıca bu süspansiyondan Giemsa boyama yapılarak makrofaj varlığı kontrol edildi. RPMI-1640'da süspanse edilen hücreler 24 gözlü hücre kültür pleytlerine geçildi, üzerine Dulbecco's modifiye Eagle minimal essential medium F12 (DMEM-F12, Biocrom, Germany) ve %5 fotal dana serumu (Biochrom, Germany) eklenerek 24 saat 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. Yüzeye yapışık olmayan hücreler PBS ile yıkanarak uzaklaştırıldı, yapışık olan makrofajlar ise hücre vasatı yenilenerek saklandı (Thumbikat ve ark 2005).

2.8. İnokulumların Hazırlanması

2.8.1. Lökotoksin Hazırlanması

Lökotoksin hazırlanmasında Atapattu ve Czuprynski (2005) tarafından bildirilen yöntem modifiye edilerek kullanıldı. *M. haemolytica* suşu kanlı agara ekildi ve 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. 12–15 saat sonra bir öze dolusu koloni 10 ml %5 maya ekstraktı (Difco, 212750) içeren BHI buyyona (Oxoid, CM0225) ekildi. Buyyon kültürü, rotatif çalkalayıcıda 8 rpm'de çalkalanarak 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Bu süspansiyon, 500 ml'lik erlende bulunan 200 ml %5 maya ekstraktı içeren BHI buyyona eklendi ve rotatif çalkalayıcıda 120 rpm'de çalkalanarak 37°C'de 2 saat inkübe edildi. Kültür, 6000 rpm'de 15 dk santrifüj edildikten sonra bakteri çöküntüsü 200 ml RPMI–1640 (4 mM L-glutamin içeren) medium içinde süspanse edilerek rotatif çalkalayıcıda 120 rpm'de çalkalandı ve 37°C'de 4 saat inkübe edildi. Süspansiyon 7500 rpm'de 15-20 dk santrifüj edildi. Süpernatant 0.2 µm por çaplı filtreden geçirildi. Elde edilen filtrat lökotoksin kaynağı olarak kullanılmak üzere -70°C'de saklandı.

2.8.2. Canlı *M. haemolytica* Kültürünün Hazırlanması

M. haemolytica CBA'ya ekilerek 37°C'de bir gece boyunca inkübe edildi. Üreyen kolonilerden 10 ml RPMI-1640'a geçildi ve 37°C' de birkaç saat beklendi. Daha sonra bakteri sayımı yapıldı ve kalan kültür +4°C'ye kaldırıldı. Buna göre 10 ml RPMI-1640'dan 1 ml alındı ve içinde steril 9 ml FTS (%0.9'luk Fizyolojik Tuzlu Su) bulunan ilk tüpe 1 ml geçildi ve bu tüpten pipetasyon yapılarak logaritma 10 tabanına göre sulandırmalar hazırlandı. Daha sonra 4., 5. ve 6. tüplerden CBA'ya yayma ekim yöntemi ile ekim yapıldı, 37°C'de 24 saat inkübe edildi ve kültürün ml'sindeki bakteri hesaplandı. Bu kültürden deneysel inokulasyonda kullanılmak üzere log10 tabanına göre sulandırmalar hazırlandı.

2.8.3. *M. haemolytica* Kaynatılmış Tüm Hücrelerin Hazırlanması

M. haemolytica 10 ml RPMI-1640'a süspanse edildi ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda süspansiyon 100°C'de yarım saat kaynatıldı. Oda ısısında bir müddet soğuması beklenen kaynatılmış süspansiyon, - 20°C'de 10–15 dk bekletildi. Kaynatma ve soğutma işlemleri tekrarlandı. Elde edilen süspansiyon kullanılmak üzere -70°C'de saklandı.

2.9. Hücre Kültürüne Deneysel İnokülasyon

Turbinata hücreleri ve makrofajlar 96 ve 24 gözlü pleytlere geçildi ve 24–48 saat 37°C' de %5 CO₂'li etüvde bekletildi. 96 gözlü hücre kültür pleytleri TUNEL metodu ve Acridine orange-Ethidium bromide boyama için, 24 gözlü hücre kültür pleytleri ise DNA jel elektroforezi için kullanıldı. Hazırlanan canlı *M. haemolytica* kültürü ve LKT sulandırmaları her göze farklı sulandırma gelecek şekilde eklendi. Kaynatılmış tüm hücre süspansiyonu da

sulandırılarak aynı şekilde kullanıldı. Son gözler ise negatif kontroller için kullanıldı. Canlı *M. haemolytica*, LKT ve kaynatılmış tüm hücre ile deneysel inokulasyon tamamlandıktan sonra değerlendirilene kadar 37°C' de %5 CO₂'li etüvde bekletildi. Değerlendirme zaman bağımlı olarak 0., 3., 6. ve 18. saatlerde yapıldı.

2.10. Canlı *M. haemolytica* Kültürü, LKT ve Kaynatılmış Tüm Hücrenin Türbinata Epitel Hücreleri ve Makrofajlar Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

Canlı *M. haemolytica* kültürü, LKT ve kaynatılmış tüm hücrenin turbinata epitel hücreleri ve makrofajlar üzerindeki etkilerinin görülmesi amacıyla yapıldı. Test yapılırken aşağıdaki adımlar izlendi.

- Turbinata hücreleri ve makrofajlar 24 gözlü hücre kültür pleytlerine geçildi ve hücrelerin yüzeyi kaplaması için 48 saat 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi.
- Daha sonra hücrelerin üzerine canlı *M. haemolytica* kültürü, LKT ve kaynatılmış tüm hücrenin log10 tabanına göre sulandırılmaları her göze bir sulandırma gelecek şekilde eklendi ve hücrelerin yapışması için 37°C'de % 5 CO₂'li etüvde 3-4 saat inkübe edildi. Negatif kontrol olarak deneysel inokulasyon yapılmamış hücreler kullanıldı.
- Hücrelerin üstüne FTS içindeki %0,4 tripan mavisi eklendi.
- Mikroskop altında 30 dk içinde boyayı alan hücreler sayıldı.

Testte mikroskopta sayılan ölü hücrelerin, toplam hücre sayısına oranı değerlendirildi (Wang ve ark. 1998).

2.11. Apoptozisin Belirlenmesi

2.11.1. TUNEL (TdT-mediated dUTP-X nick end Labeling)

TUNEL (TdT-mediated dUTP-X nick end labeling) metodu, apoptozisin erken evresinde meydana gelen çift ve tek iplikçik DNA kırıklarının belirlenmesi amacıyla kullanıldı. TUNEL metodu, DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega, TB235) kit protokolüne uygun şekilde yapıldı. Protokole göre aşağıdaki adımlar uygulandı.

- Hücreler %4'lük paraformaldehit ile +4°C' de 25 dk fikze edildi. Sonra PBS ile 5 dk oda ısısında 2 kere yıkandı.
- Hücreler %0.2'lik Triton X-100 solüsyonunda 5 dk permeabilize edildi. Sonra PBS ile 5 dk oda ısısında 2 kere yıkandı. Bu aşamada pozitif kontroller hazırlandı.
- Hücreler 100 µl dengeleme buffer (Equilibration Buffer) ile kaplandı ve 5-10 dk oda ısısında denge sağlandı.
- Hücreler dengelenirken, örnek sayısına göre yeterli miktarda rTdT inkübasyon buffer hazırlandı.
- Hücreler doku kâğıtları ile kurulandı ve 50 µl rTdT inkübasyon buffer eklendi. Pleytler ışıktan korumak için alüminyum folyo ile kaplandı ve 37°C'de 60 dk bekletildi.
- Hücreler 2xSSC ile oda sıcaklığında 15 dk muamele edildi.
- Hücreler oda sıcaklığında 5 dk PBS ile bağlanmamış Fluorescein-12-dUTP'nin uzaklaştırılması için yıkandı. Bu işlem 3 defa tekrarlandı.
- Hücreler propidium iodide (Applichem, Darmstadt, Germany) solusyonu ile oda sıcaklığında 15 dk boyandı. Boyama işlemi boyunca pleytler ışıktan korunmak için alüminyum folyo ile kaplandı.
- Hücreler oda sıcaklığında 5 dk distile su ile yıkandı. Yıkama işlemi 3 defa tekrarlandı.

- Hücreler doku kâğıtları ile kurutuldu ve floresan mikroskop altında incelendi. Standart flurescein filtre aşağıda tanımlandığı gibi analiz edildi.

520±20 nm	fluresceinin yeşil floresanı
620nm<	propidium iodidin kırmızı floresanı

2.11.1.1. Pozitif Kontrollerin Hazırlanması

DNA fragmentasyonunun belirlenmesi için pozitif kontrol hücrelerinin prosedürü aşağıda anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. TUNEL prosedüründe anlatılan fizyasyon ve permeabilizasyon adımları pozitif kontroller için de yapıldı.

- Fikze edilmiş hücrelere 100 µl DNase I buffer eklendi ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.
- Hafifçe vurularak sıvı hücrelerden uzaklaştırıldı, 100 µl 5.5-10 ünite/ml DNase I içeren DNase I bufferdan eklendi ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.
- Hücreler steril distile su ile 3-4 kez yıkandı ve Tunel prosedürüne dengeleme aşamasından devam edildi.

2.11.2. DNA Agaroz Jel Elektroforezi

DNA jel elektroforezi apoptotik hücre ölümünün belirlenmesi ve DNA fragmentasyonunun doğruluğunu kanıtlamak amacı ile kullanıldı ve 2 aşama da gerçekleştirildi.

2.11.2.1. Hücresel Genomik DNA İzolasyonu

Hücresel genomik DNA izolasyonu Fermentas Genomik DNA Purifikasyon kiti (MBI Fermentas, Lithuania) kullanılarak, kit protokolüne uygun şekilde yapıldı. Buna göre aşağıdaki adımlar uygulandı.

- Hücrelerin tripsinizasyon metodu ile birbirinden ve yüzeyden ayrılması sağlandı. Toplanan hücreler 200 µl distile su içerisinde süspanse edildi.
- 200 µl örnek 400µl lizis solüsyonu ile karıştırılarak 65⁰C'de 5 dk inkube edildi.
- 600µl kloroform eklenerek karıştırıldı ve 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi.
- 720 µl steril distile su, 80 µl 10x konsantre solüsyonu ile karıştırılarak presipitasyon solüsyonu hazırlandı.
- Santrifüj sonrası tüpün üst kısmındaki DNA içeren sıvı faz yeni bir tüpe alındı ve üzerine 800 µl presipitasyon solüsyonu eklendi. Oda sıcaklığında 1-2 dk karıştırıldı. 10.000 rpm'de 2 dk. santifüj edildi.
- Süpernatant tamamıyla alındı. DNA peletine 100 µl 1.2M NaCl solüsyonu eklenip vortekslenerek DNA peletinin iyice çözünmesi sağlandı.
- 300 µl soğuk etanol eklenerek DNA'nın prespite olması için -20⁰C'de 10 dk bekletildi. 10.000 rpm'de 3 dk. santrifüj edildi. Üst kısımdaki etanol dökülerek pelet %70'lik soğuk etanol ile yıkandı. DNA 100 µl distile suda iyice karıştırılarak çözdürüldü.

Ekstraksiyonu yapılan DNA örnekleri DNA agaroz jelde koşturulana kadar -20⁰C'de template DNA olarak kullanılmak üzere saklandı.

2.11.2.2. Elektroforez

Deneysel inokulasyon yapılmış hücreler ile pozitif ve negatif kontrol hücrelerinden elde edilen DNA örnekleri, 200 bp fragmentasyonun görülmesi için (DNA merdiveni) %1.5'luk agaroz jelde 50V'da 7 saat boyunca koşturuldu. DNA ethidium bromide ile boyandı ve UV ile görünür hale getirildi. Negatif kontrol olarak infekte edilmemiş hücreler aynı işlemlerden geçirilerek kullanıldı. Pozitif kontrol olarakda DNase 1 ile muamele edilmiş hücreler, aynı işlemlerden geçirilerek kullanıldı (Korostoff ve ark. 1998, Sun ve ark. 1999).

2.11.3. Acridine Orange- Etidium Bromide Boyama

Acridine orange (Applichem, Darmstadt, Germany)-Ethidium bromide (Applichem, Darmstadt, Germany) boya kombinasyonu, hücrelerin membran bütünlüğü ve nükleer morfolojisinin belirlenerek apoptozisin ölçülmesi amacıyla kullanıldı (Gohel ve ark.1999, Menaker ve ark. 2004). Buna göre aşağıdaki adımlar uygulandı.

- Deneysel infeksiyon sonucunda 18. saatte hücreler PBS ile 1 defa yıkandı.
- 100 µg/ml acridine orange ve 100 µg/ml ethidium bromide içeren PBS ile sulandırılmış boya solüsyonu hazırlandı.
- Solusyondan 100 µl her göze eklendi, oda ısısında birkaç dk beklendi. Hücreler PBS ile 1 defa yıkandı.
- Daha sonra örnekler her gözde 600 hücre sayılarak floresan mikroskopta standart flurescein filtre kullanılarak değerlendirildi.

2.12. Reverse Transkriptaz- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile CD18/CD11a (LFA-1) ve TLR-4 (Tool-like receptor 4) Gen Transkripsiyonunun İncelenmesi

Sığır turbinata epitel hücrelerinde, LKT spesifik hücre yüzey molekülleri CD18/CD11a (LFA-1) ve LPS spesifik TLR-4 (Tool-like receptor 4) hücre yüzey molekülü, gen transkripsiyonun kontrolü amacıyla Reverse Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) metodu kullanıldı. Hücrelerde bu molekülleri kodlayan mesenger RNA'lar (mRNA) complementer DNA'ya (cDNA) çevirildi (McClenahan ve ark., 2008). Ayrıca pozitif kontrol olarak lökositler kullanıldı (Jeyaseelan ve ark., 2000).

RT-PCR metodunda CD18, CD11a ve TLR-4 için oligonükleotid primerler ile 400 ve 500 bp uzunluğunda ampikonlar oluşturulması hedeflendi. Bu primer çiftlerinin baz formülasyonları aşağıdaki gibidir (McClenahan ve ark., 2008);

CD18 Forward primer: 5'- GGCCCTCAATGGCATCAC-3'

CD18 Reverse primer: 5'- CCCACCGATGGGTAGTCAAA-3'

CD11a Forward primer: 5'- GGAGGCCGGGTGTTTATCTAC-3'

CD11a Reverse primer: 5'- GGTGGAATAGGAGCACTCGACTT-3'

TLR-4 Forward primer: 5'- TATTTCTTATACCAACATCCGCATTG-3'

TLR-4 Reverse primer: 5'- TTCACAAACACAAGCAAATGCA-3'

RT-PCR, 3 aşamada gerçekleştirildi.

2.12.1. Hücresel mRNA Ekstraksiyonu

Hücresel mRNA ekstraksiyonu fenol-kloroform yöntemi kullanılarak yapıldı (Sambrook ve Russell, 2001). Buna göre aşağıdaki adımlar uygulandı.

- Hücrelerin tripsinizasyon metodu ile birbirinden ve yüzeyden ayrılması sağlandı. Toplanan hücreler 400 µl RPMI-1640 medyum içerisinde süspanse edildi.
- Süspanse edilmiş hücreler üzerine eşit hacimde (400µl) denatürasyon solüsyonu eklendi ve 15 sn vortekslendi.
- Karışım üzerine 300 µl asit fenol (su ile equilibre edilmiş), 300 µl kloroform/izoamilalkol (49:1 oranında) ve 100 µl 3 M Na asetat (pH:4.2) eklendi ve 15 sn vortekslendi.
- Karışım 10.000–14.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve santrifüj sonunda üsteki sıvıdan 700 µl alınarak yeni bir ependorfa koyuldu.
- Sıvı üzerine eşit hacimde (700µl) -20⁰C'deki izopropil alkol eklendi ve 10 sn vortekslendi.
- Karışım nükleik asitlerin presipitasyonu için -80⁰C'de 1 saat bekletildi.
- Süre sonunda karışım 12.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
- Tüp dibine çöken pelet 300 µl %70'lik etanol (ETOH) ile dikkatlice yıkandı ve 12.000 rpm'de 2–3 dk santrifüj edildi.
- ETOH aspire edildikten sonra oda sıcaklığında veya 37⁰C'de kurutulan pelet 20 µl steril distile su ile süspanse edildi ve cDNA eldesi için kullanılmak üzere -20⁰C'de saklandı.

2.12.2. cDNA Sentezi

Ekstrakte edilen mRNA örneklerinden cDNA eldesi Fermentas RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (#K1622) kullanılarak, kit protokolüne uygun şekilde yapıldı. Buna göre cDNA sentezinde kullanılan bileşenler aşağıdaki gibidir;

Karışım 1

Random hexamer	0.5 µl
Distile su	3 µl

Karışım 2

5X buffer	2 µl
DNTP mix	1 µl
Reverse transkriptase	0.5 µl

cDNA sentezinde kullanılan örnek sayısına göre hazırlanan reaksiyon karışımı DNase ve RNase-free PCR tüplerine dağıtıldı. Üzerine 3 µl template RNA'lar eklendi. Tüpler thermal cycler'a konuldu ve 25⁰C'de 5 dk inkübe edildi. Sonrasında 42⁰C'de 60 dk inkübasyon ile reverz transkripsiyon işlemi gerçekleştirildi ve 70⁰C'de 5 dk'lık inkübasyon ile reaksiyon sonlandırıldı. Elde edilen cDNA'lar PCR'da kullanıldı.

2.12.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Sentezlenen cDNA'lara PCR metodu uygulandı (McClenahan ve ark., 2008). PCR' da amplifikasyonda kullanılan bileşenler aşağıda verildi.

Distile su	18.5 µl
10xPCR buffer	3 µl
MgCl ₂	2.4 µl
DNTP mix	1 µl
Primer 1	0.8 µl
Primer 2	0.8 µl
Taq DNA polimeraz	0.5 µl

PCR’da kullanılan örnek sayısına göre hazırlanan reaksiyon karışımı DNase ve RNase-free PCR tüplerine dağıtıldı. Üzerine 3 µl template cDNA’lar eklendi. Negatif kontrol tüplerinde ise distile su kullanıldı. Reaksiyon her bir primer çifti için ayrı ayrı uygulandı. Tüpler 50°C’ye ısıtılmış thermal cycler’a konuldu. PCR toplam 35 siklustan oluştu. Her sikluskı sıcaklıklar ve süreleri aşağıdaki gibidir.

95°C	30 sn
55°C	45 sn
72°C	1 dk

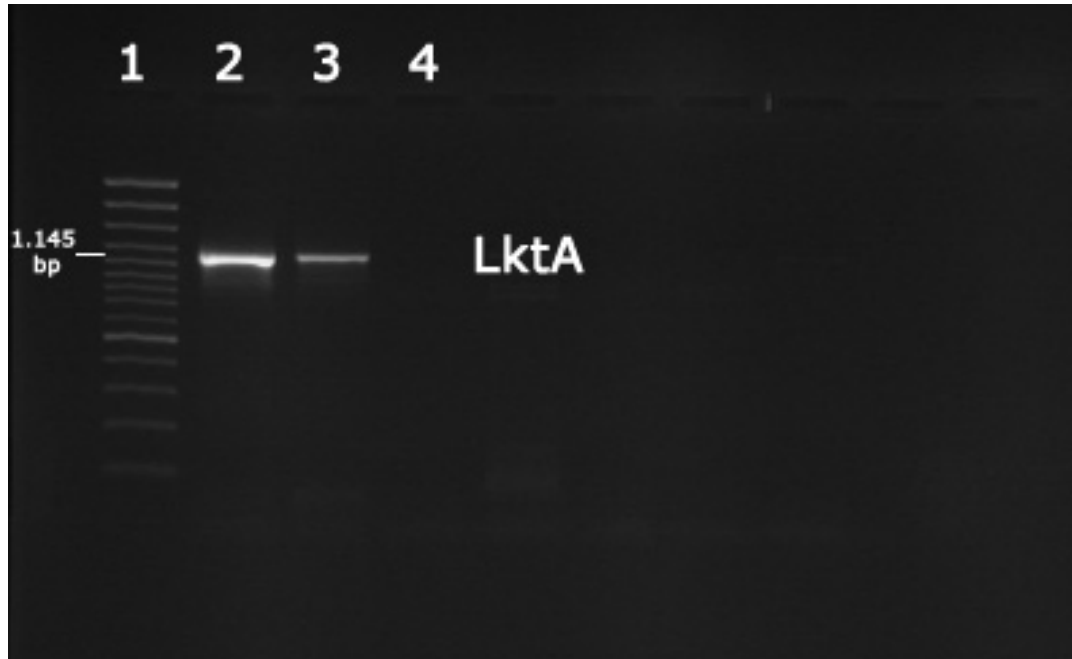
PCR ürünleri göz başına 10 µl örnek hacminde, %1.5’luk agaroz jelde 120 voltta 45 dk elektroforez işlemine tabi tutuldu. Elektroforez sonuçları 400 ve 500 bp arasındaki bant büyüklüğüne göre değerlendirildi (McClenahan ve ark., 2008).

3. BULGULAR

3.1. *M. haemolytica* Suşları PCR Bulguları

PCR çalışmalarında Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden sağlanan Sığır orijinli *M. haemolytica* A1 suşu ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda bulunan *M. haemolytica* A1 suşunun LktA genleri tespit edildi (Şekil 3.1). Negatif kontrol olan *E. coli* suşunda da bu gene rastlanamadı.

Şekil 3.1. LktA gen düzeyinde *M. haemolytica* suşlarının PCR analizi sonucu



1; 100bp'lık DNA marker, 2; *M. haemolytica* Pendik suşu, 3; *M. haemolytica* Ankara suşu, 4; negatif kontrol (*E. coli*)

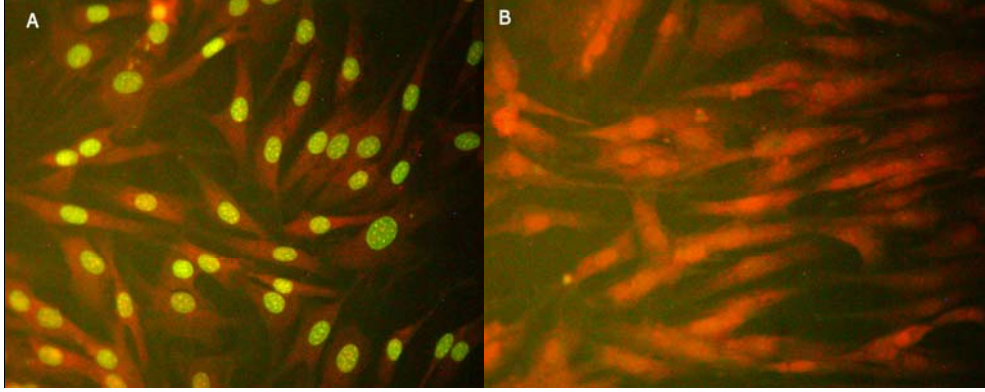
3.2. Canlı *M. haemolytica* Kültürü, LKT ve Kaynatılmış Tüm Hücrenin Türbinata Epitel Hücreleri ve Makrofajlar Üzerindeki Etkisi

Tripan mavisi boya alım testi sonucu yapılan sayımlarda canlı *M. haemolytica* kültürünün 10^{-1} sulandırması ve kaynatılmış tüm hücrenin sulandırılmamış süspansiyonu turbinata hücrelerinin %10'nun ölümüne neden oldu. LKT ise turbinata hücreleri ölümüne neden olmadı. Ayrıca yapılan sayımlarda canlı *M. haemolytica* kültürünün 10^{-1} ve LKT'nin 10^{-3} sulandırması makrofajların %50'sini öldürdü. Kaynatılmış tüm hücrenin ise sulandırılmamış süspansiyonu makrofajlar üzerinde bu etkiyi gösterdi.

3.3. Apoptozis Bulguları

3.3.1. TUNEL Testi Bulguları

TUNEL metodunda kullanılan flüorescein apoptotik hücrelerin fragmente olmuş DNA'larını yeşile boyadı. Propidium İodide ise hem apoptotik hem de apoptotik olmayan hücreleri kırmızıya boyadı. Değerlendirme hem turbinata hücreleri hem de makrofajlarda florasan mikroskop altında standart flüorescein filtre kullanılarak doz ve zaman bağımlı olarak yapıldı. Pozitif ve negatif kontrollerdeki sağlam ve apoptotik hücreler sayıldı (Şekil 3.2), deneysel inokulasyon sonuçları ile karşılaştırıldı. Her gözde toplam 600 hücre sayıldı ve apoptotik hücrelerin sayısı toplam hücre sayısına oranlanarak yüzdesi hesaplandı.



Şekil 3.2. TUNEL testinde turbinata hücre kontrolleri A) pozitif kontrol, B) negatif kontrol

3.3.1.1.Canlı *M. haemolytica* Kültürünün Etkilediği Turbinata Hücrelerinde TUNEL Bulguları

Canlı *M. haemolytica* kültürünün etkilediği turbinata hücrelerinde apoptozis 0., 3., 6. ve 18. saatlerde doz bağımlı olarak değerlendirildi. Turbinata hücrelerinde zaman ve doz bağımlı apoptotik hücre sayıları ve toplam hücre sayısına göre yüzdesi çizelge 3.1’de verildi.

Çizelge 3.1 Canlı *M. haemolytica* kültürünün etkilediği turbinata hücrelerinde zaman ve doz bağımlı apoptotik hücre sayıları ve toplam hücre sayısına göre yüzdesi

Canlı <i>M. haemolytica</i> Kültürü Sulandırılmaları	Apoptotik Hücre Sayısı (%apoptotik hücre/600 hücre)			
	0. saat	3. saat	6. saat	18. saat
10^{-1}	1 (%0.17)	1 (%0.17)	2 (%0.3)	7 (%1.2)
10^{-2}	0 (%0)	1 (%0.17)	1 (%0.17)	4 (%0.7)
10^{-3}	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	2 (%0.3)
10^{-4}	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	2 (%0.3)
Negatif kontrol	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
Pozitif kontrol	600 (%100)	600 (%100)	600 (%100)	600 (%100)

3.3.1.2. LKT'nin Etkilediği Turbinata Hücrelerinde TUNEL Bulguları

LKT'nin etkilediği turbinata hücrelerinde apoptozis 0., 3., 6. ve 18. saatlerde doz bağımlı olarak değerlendirildi. Turbinata hücrelerinde zaman ve doz bağımlı apoptotik hücre sayıları ve toplam hücre sayısına göre yüzdesi çizelge 3.2'de verildi.

Çizelge 3.2. LKT'nin etkilediği turbinata hücrelerinde zaman ve doz bağımlı apoptotik hücre sayıları ve toplam hücre sayısına göre yüzdesi

LKT Sulandırılmaları	Apoptotik Hücre Sayısı (%apoptotik hücre/600 hücre)			
	0. saat	3. saat	6. saat	18. saat
10^{-1}	2 (%0.3)	3 (%0.5)	3 (%0.5)	14 (%2.3)
10^{-2}	1 (%0.17)	1 (%0.17)	1 (%0.17)	5 (%0.8)
10^{-3}	0 (%0)	1 (%0.17)	1 (%0.17)	2 (%0.3)
10^{-4}	0 (%0)	0 (%0)	1 (%0.17)	3 (%0.5)
Negatif kontrol	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
Pozitif kontrol	600 (%100)	600 (%100)	600 (%100)	600 (%100)

3.3.1.3. Kaynatılmış Tüm Hücrenin Etkilediği Turbinata Hücrelerinde TUNEL Bulguları

Kaynatılmış tüm hücrenin etkilediği turbinata hücrelerinde apoptozis 0., 3., 6. ve 18. saatlerde doz bağımlı olarak değerlendirildi. Turbinata hücrelerinde zaman ve doz bağımlı apoptotik hücre sayıları ve toplam hücre sayısına göre yüzdesi çizelge 3.3'de verildi.

Çizelge 3.3 Kaynatılmış tüm hücrenin etkilediği turbinata hücrelerinde zaman ve doz bağımlı apoptotik hücre sayıları ve toplam hücre sayısına göre yüzdesi

Kaynatılmış tüm hücre sulandırmaları	Apoptotik Hücre Sayısı (%apoptotik hücre/600 hücre)			
	0. saat	3. saat	6. saat	18. saat
10^{-1}	1 (%0.17)	1 (%0.17)	0 (%0)	0 (%0)
10^{-2}	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
10^{-3}	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	2 (%0.3)
10^{-4}	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
Negatif kontrol	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
Pozitif kontrol	600 (%100)	600 (%100)	600 (%100)	600 (%100)

3.3.1.4.Canlı *M. haemolytica* Kültürünün Etkilediği Makrofajlarda TUNEL Bulguları

Canlı *M. haemolytica* kültürünün etkilediği makrofajlarda apoptozis 0., 3., 6. ve 18. saatlerde doz bağımlı olarak değerlendirildi. Makrofajlarda zaman ve doz bağımlı apoptotik hücre sayıları ve toplam hücre sayısına göre yüzdesi çizelge 3.4'de verildi.

Çizelge 3.4. Canlı *M. haemolytica* kültürünün etkilediği makrofajlarda zaman ve doz bağımlı apoptotik hücre sayıları ve toplam hücre sayısına göre yüzdesi

Canlı <i>M. haemolytica</i> Kültürü Sulandırmaları	Apoptotik Hücre Sayısı (%apoptotik hücre/600 hücre)			
	0. saat	3. saat	6. saat	18. saat
10^{-1}	4 (%0.6)	92 (%15.3)	97 (%16.1)	93 (%15.5)
10^{-2}	5 (%0.8)	67(%11.1)	86 (%14.3)	89 (%14.8)
10^{-3}	4 (%0.6)	56 (%9.3)	93 (%15.5)	87 (%14.5)
10^{-4}	3 (%0.5)	32 (%5.3)	82 (%13.6)	79 (%13.1)
Negatif kontrol	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
Pozitif kontrol	600 (%100)	600 (%100)	600 (%100)	600 (%100)

3.3.1.5. LKT'nin Etkilediği Makrofajlarda TUNEL Bulguları

LKT'nin etkilediği makrofajlarda apoptozis 0., 3., 6. ve 18. saatlerde doz bağımlı olarak değerlendirildi. Makrofajlarda zaman ve doz bağımlı apoptotik hücre sayıları ve toplam hücre sayısına göre yüzdesi çizelge 3.5'de verildi.

Çizelge 3.5. LKT'nin etkilediği makrofajlarda zaman ve doz bağımlı apoptotik hücre sayıları ve toplam hücre sayısına göre yüzdesi

LKT Sulandırıcıları	Apoptotik Hücre Sayısı (%apoptotik hücre/600 hücre)			
	0. saat	3. saat	6. saat	18. saat
10^{-1}	2 (%0.3)	148 (%24.6)	141 (%23.3)	146 (%24.3)
10^{-2}	4 (%0.6)	137 (%22.8)	128 (%21.3)	131 (%21.8)
10^{-3}	3 (%0.5)	135 (%22.5)	137 (%22.8)	125 (%14.5)
10^{-4}	2 (%0.3)	7(%1.16)	9 (%1.5)	8 (%1.3)
Negatif kontrol	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
Pozitif kontrol	600 (%100)	600 (%100)	600 (%100)	600 (%100)

3.3.1.6. Kaynatılmış Tüm Hücrenin Etkilediği Makrofajlarda TUNEL Bulguları

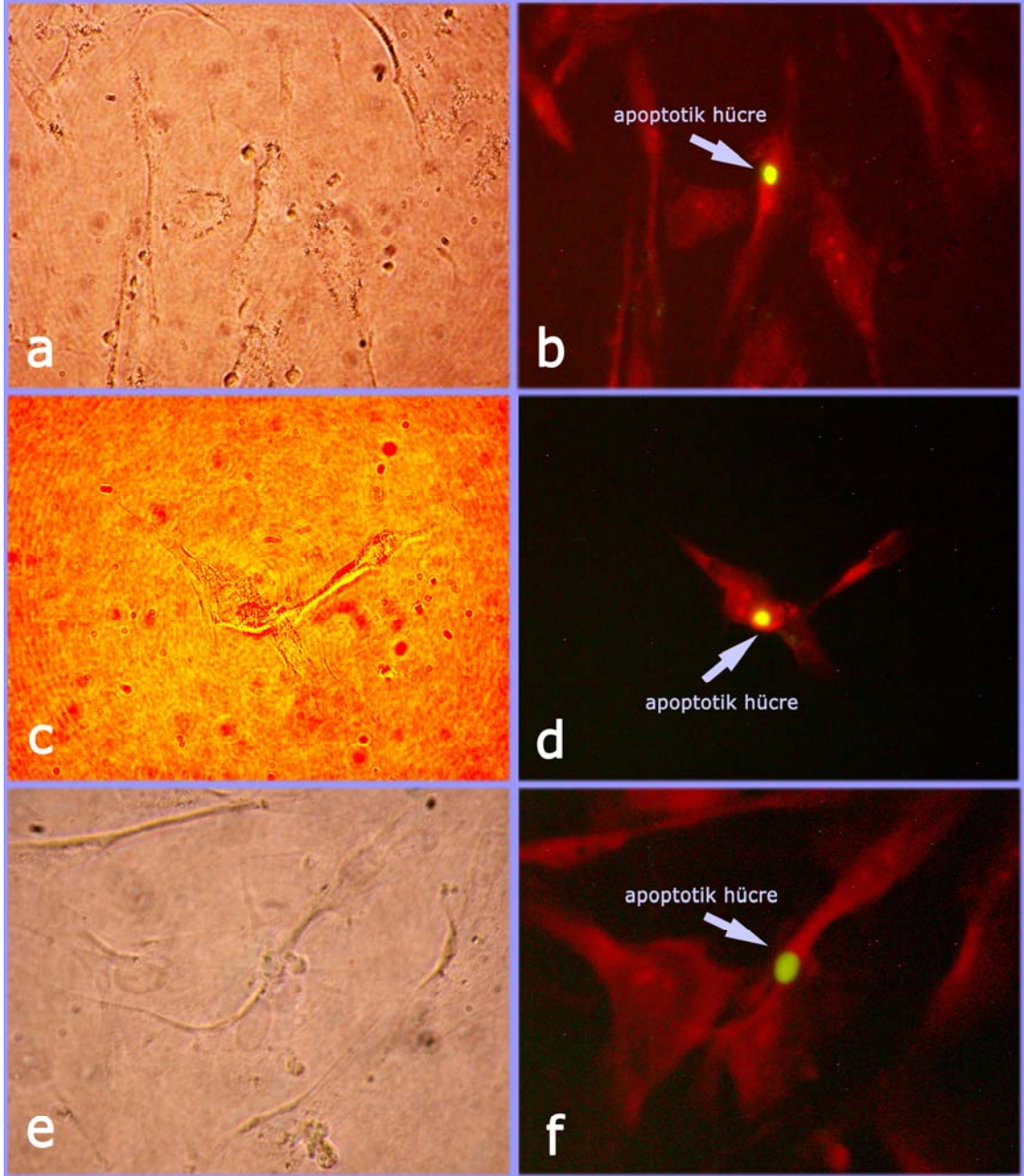
Kaynatılmış tüm hücrenin etkilediği makrofajlarda apoptozis 0., 3., 6. ve 18. saatlerde doz bağımlı olarak değerlendirildi. Makrofajlarda zaman ve doz bağımlı apoptotik hücre sayıları ve toplam hücre sayısına göre yüzdesi çizelge 3.6'da verildi.

Çizelge 3.6. Kaynatılmış tüm hücrenin etkilediği makrofajlarda zaman ve doz bağımlı apoptotik hücre sayıları ve toplam hücre sayısına göre yüzdesi

Kaynatılmış Tüm Hücre Sulandırmaları	Apoptotik Hücre Sayısı (%apoptotik hücre/600 hücre)			
	0. saat	3. saat	6. saat	18. saat
10^{-1}	1 (%0.17)	69 (%11.5)	73 (%12.1)	83 (%13.8)
10^{-2}	4 (%0.6)	44 (%7.3)	47 (%7.8)	56 (%9.3)
10^{-3}	3 (%0.5)	37 (%6.1)	30 (%5)	29 (%4.8)
10^{-4}	3 (%0.5)	13 (%2.1)	11 (%1.8)	8 (%1.3)
Negatif kontrol	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
Pozitif kontrol	600 (%100)	600 (%100)	600 (%100)	600 (%100)

M. haemolytica saf kültür, LKT ve kaynamış tüm hücre sulandırmaları ile uygulanan TUNEL testinde apoptotik hücre görünümleri Şekil 3.3'de verilmiştir.

Şekil 3.3. TUNEL testinde turbinata hücrelerinde, apoptotik hücre görüntüleri

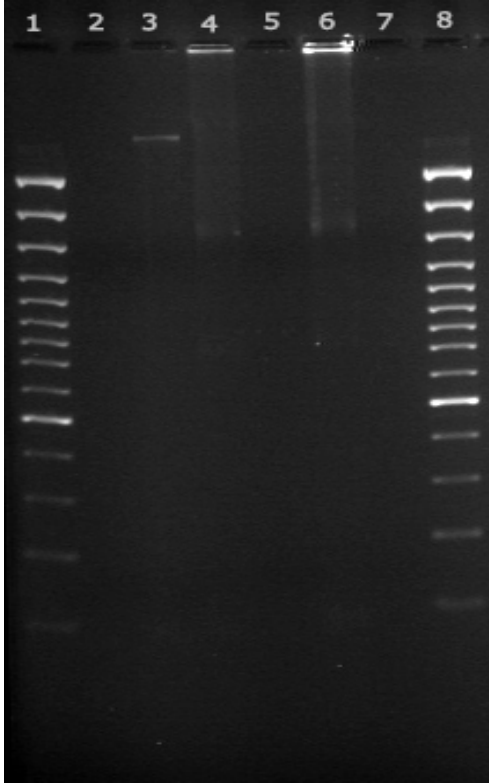


a,b; Canlı *M. haemolytica* kültürünün etkilediği türbinata hücrelerinde 18. saatte apoptotik hücre ışık ve florasan mikroskop görüntüsü, c,d; LKT'nin etkilediği türbinata hücrelerinde 18. saatte apoptotik hücre ışık ve florasan mikroskop görüntüsü, e,f; Kaynatılmış tüm hücrenin etkilediği türbinata hücrelerinde 18. saatte apoptotik hücre ışık ve florasan mikroskop görüntüsü

3.3.2. DNA Agaroz Jel Elektroforezi

TUNEL testi bulguları dikkate alınarak deneysel infeksiyon zamanı 18. saat olarak seçildi ve deneysel olarak infekte edilen hücreler, infeksiyonun 18. saatte doz bağımlı olarak kontrol edildi. Agaroz jel elektroforezi sonucu oluşan DNA merdiveni sonuçlarına bakılarak DNA fragmentasyonu değerlendirildi. Buna göre canlı *M. haemolytica*'nın kültürü, LKT ve kaynatılmış tüm hücre ile yapılan inokulasyon sonrası 18. saatte DNA ladder oluşumu turbinata hücrelerinde görülmedi, makrofajlarda ise gözlemlendi (Şekil 3.4).

Şekil 3.4. Deneysel infeksiyonun 18. saatinde DNA agaroz jel elektroforezi sonuçları



1, 8; 100bp'lık DNA marker, 2; Kaynatılmış tüm hücrenin etkilediği turbinata hücreleri, 3; Kaynatılmış tüm hücrenin etkilediği makrofajlar, 4; Canlı *M. haemolytica* kültürünün etkilediği

makrofajlar, 5; Canlı *M. haemolytica* kültürünün etkilediği turbinata hücreleri, 6; LKT'nin etkilediği makrofajlar 7; LKT'nin etkilediği turbinata hücreleri,

3.3.3. Acridine Orange- Ethidium Bromide Boyama Bulguları

TUNEL testi bulgularına göre 18. saatte seçilen hücreler boyanarak değerlendirme yapıldı. Normal hücreler yeşil florasın, apoptotik hücreler ise karakteristik kromatin yoğunlaşmalarından dolayı parlak yeşil florasın olarak görüldüler. Nekrotik hücreler ise turuncu florasın olarak görüldü. Buna göre turbinata hücrelerinde ve makrofajlarda doz bağımlı apoptotik hücre sayıları ve toplam hücre sayısına göre yüzdesi çizelge3.7'de verildi.

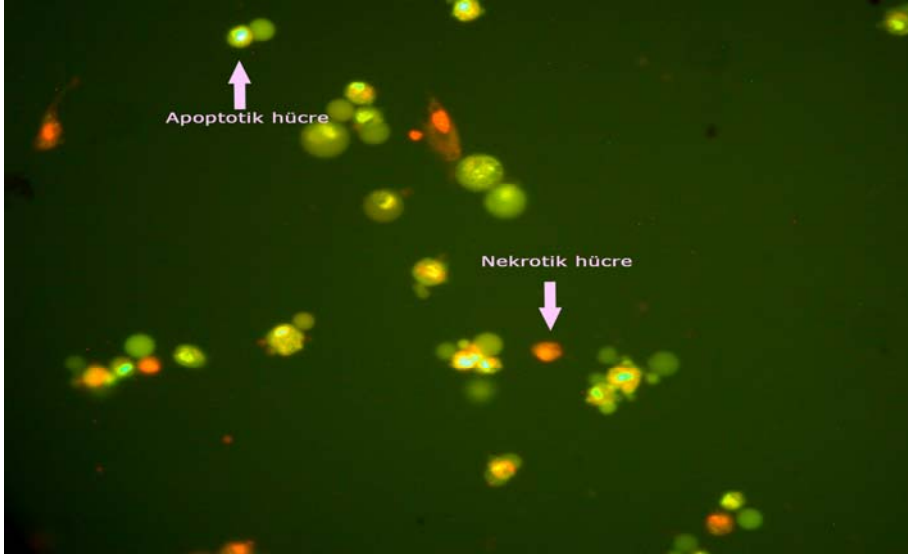
Çizelge 3.7. Turbinata hücrelerinde ve makrofajlarda doz bağımlı apoptotik hücre sayıları ve toplam hücre sayısına göre yüzdesi

İnokulum	Sulandırma	Apoptotik Hücre Sayısı (%apoptotik hücre/600 hücre)			
		Turbinata Hücreleri	Makrofajlar	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol
Canlı <i>M. haemolytica</i> Kültürü Sulandırmaları	10^{-1}	17(%2.8)	139(%23.1)	600(%100)	3(%0.5)
	10^{-2}	13(%2.1)	107(%17.8)		
	10^{-3}	11(%1.8)	96(%16)		
	10^{-4}	4(%0.6)	76(%12.6)		
LKT Sulandırmaları	10^{-1}	22(%3.6)	184(%30.6)	600(%100)	4(%0.6)
	10^{-2}	17(%2.8)	168(%28)		
	10^{-3}	9(%1.5)	117(%19.5)		
	10^{-4}	2(%0.3)	34(%5.6)		
Kaynatılmış Tüm Hücre sulandırmaları	10^{-1}	7(%1.16)	99(%16.5)	600(%100)	2(%0.3)
	10^{-2}	5(%0.8)	75(%12.5)		
	10^{-3}	5(%0.8)	34(%5.6)		
	10^{-4}	1(%0.17)	25(%4.1)		

M. haemolytica saf kültür, LKT ve kaynatılmış tüm hücre sulandırmaları ile turbinata hücrelerine deneysel inokulasyon sonrası uygulanan acridine

orange-ethidium bromide boyamada apoptotik ve nekrotik hücre görünüşleri Şekil 3.5’de verilmiştir.

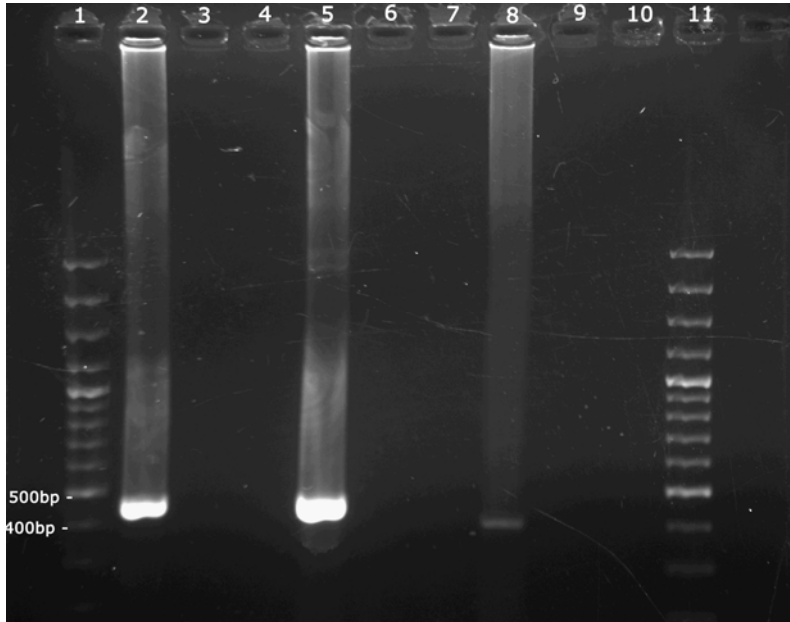
Şekil 3.5. Acridine orange-ethidium bromide boyamada apoptotik ve nekrotik hücre görünüşleri



3.4. CD18/CD11a ve TLR-4 Gen Transkripsiyonu için RT-PCR Bulguları

RT-PCR sonucunda bovine turbinata epitel hücrelerinde CD18/CD11a ve TLR-4 hücre yüzey moleküllerini kodlayan mRNA tespit edilmedi. Pozitif hücre kontrolü olarak kullanılan lökositlerde ise hem CD18/CD11b hem de TLR-4 400–500 bp büyüklüğünde bantlar görüldü. PCR’da negatif kontrolde de bu bantlara rastlanmadı (Şekil 3.6).

Şekil 3.6. CD18/CD11a ve TLR-4 gen transkripsiyonu için RT-PCR Bulguları



1,11; 100bp'lık DNA marker, 2; lökositlerde CD18, 3; negatif PCR kontrolü, 4; turbinata hücrelerinde CD18, 5; lökositlerde CD11a, 6; negatif PCR kontrolü, 7; turbinata hücrelerinde CD11a, 8; lökositlerde TLR-4, 9; negatif PCR kontrolü, 10; turbinata hücrelerinde TLR-4

4. TARTIŞMA

Mannheimia haemolytica üst solunum yollarında fakültatif patojen olarak bulunan bir mikroorganizmadır ve sığır solunum hastalıklarının en önemli etkenidir. Çoğunlukla, sığırda shipping fever pneumoni olarak adlandırılan sığır pnömonik mannheimiozise (pasteurellozis) neden olan primer ajandır (Atapattu ve Czuprynski, 2005; Thumbikat ve ark. 2005; Aydın, 2006; Wang ve ark., 1998). Bu hastalık et ve süt sığırı yetiştiriciliğinde yaygın olup, önemli ekonomik kayıplara neden olur (Sun ve ark., 2000 ;Thumbikat ve ark. 2005). Nakliye, viral enfeksiyonlar, sütten kesme, kalabalıkta bulunma gibi stres yaratan durumlar esnasında *M. haemolytica* üst solunum yollarında çoğalır, sonrasında alt solunum yollarında kolonize olur ve ağır fibrinli plöropnömoniye neden olan çeşitli virulens faktörleri üretir (Sun ve ark., 2000). Bu virulens faktörleri; konak savunmasından kaçmaya yarayan ve bakteriyi fagositozdan koruyan kapsüler polisakkarit, adhezinler, dış membran proteinleri (OMP), nöraminidaz, nötrofil kemotaksisini uyaran ve in vitro sığır endotelial hücreleri için toksik olan lipopolisakkarit (endotoksin) ve akciğer enfeksiyonlarında önemli bir faktör olabilen kuvvetli bir lökotoxin (LKT)'i kapsar.

Gram negatif bakterilerde hücre duvarında önemli bir komponent olan LPS (lipopolisakkarit), *M. haemolytica*'nın önemli bir virulens faktörüdür ve in vitro ortamlarda klasik endotoksin etkisi gösterir (Diker ve ark., 1995; Jeyaseelan ve ark., 2002). LPS'nin bu özelliği kompleks mekanizmalar ile solunum sistemi endoteliumu patolojisine katkıda bulunmasına ve sığır endotelial hücreleri için sitotoksik olmasını sağlar (Jeyaseelan ve ark., 2002; McClenahan ve ark., 2008; Leite ve ark., 2003; Li ve Clinkenbeard, 1999; Lafleur ve ark., 2001). McClenahan ve ark. (2008) hem LPS hemde LKT (lökotoxin)'nin sığır mikrovasküler endotelial ve alveolar epitelyum hücrelerinde permeabilite, morfoloji ve apoptozis seviyelerinde etkilerini inceledikleri çalışmalarında LPS'nin endotelial hücrelerde apoptotik etkileri sahip olduğunu fakat epitelyum hücrelerde bu etkinin görülmediğini

bildirmişlerdir. Bu bilgiler doğrultusunda bu araştırmada LPS içeriği yönünden kaynatılmış tüm hücre süspansyonu deneysel inokulum olarak kullanıldı.

LKT, logaritmik büyüme evreleri sırasında *M. haemolytica* tarafından sentezlenen ve salgılanan 104-kDa por oluşturan RTX toksin ailesinin bir üyesi olan kuvvetli kalsiyum bağımlı sitolitik bir toksindir (Stevens ve Czuprynski 1996; Thumbikat ve ark. 2005). Bu ailenin üyeleri büyük ölçüde değişken etki mekanizmalarına ve konak spesifitelerine sahiptir (Thumbikat ve ark. 2005). LKT, sentezi, aktivasyonu ve salgılanması için bakteriyel kromozomda polisistronik operon bölgesinde *LktC*, *LktA*, *LktB* ve *LktD* olmak üzere 4 gen tarafından kodlanır. *LktA* ise yapısal toksini kodlar (Rice ve ark., 2008; Jeyaseelan ve ark., 2002; Zecchinon ve ark., 2005). Farklı hayvan gruplarından izole edilen *M. haemolytica* ve *Pasteurella trehalosi* izolatlarında *LktA* geninin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile tespiti üzerine yapılan bir çalışmada (Fisher ve ark., 1999), 147 *M. haemolytica* suşunun 90'ında *LktA* geninin bulunduğunu ve bu suşların β -hemolitik aktiviteye sahip olduklarını göstermiş, lökotoksin varlığı ile β -hemolitik aktivite arasında paralel bir ilişki bulmuşlardır. Sonuç olarak, lökotoksinin *M. haemolytica*'nın en önemli virulens faktörü olduğu kanısına varılmıştır. Bu bilgilerden yola çıkılarak bu çalışmada, kullanılan *M. haemolytica* suşunun *LktA* geni kontrol edilerek, toksin üretiminde kullanılabileceği anlaşıldı ve bir bakımda *M. haemolytica* kontrolü yapıldı. Üretilen LKT ise bu araştırmada deneysel inokulum olarak kullanıldı.

Apoptozis, enerji bağımlı, tek bir hücrede, nükleer ve sitoplazmik yoğunlaşma, azalmış mitokondrial membran potansiyeli, hücre büzülmesi, sitoplazmik azalma, zeiozis (dinamik plazma membran kabarması), DNA fragmentasyonu ve membranla kaplı hücresel parçalanma (apoptotik parçacıklar) ile karakterize bir programlanmış hücre ölümü yoludur (Dockrell, 2001; Fink ve Cookson, 2005; Menaker ve Jones, 2003; Öviz, 2004; Perl ve ark, 2005; Tomatır, 2003). Patojen mikroorganizmaların birçoğu hem toksik ürünler üreterek hem de konak hücreleri infekte ederek ökaryotik hücrelerin ölümüne sebep olmak için bu yolu kullanırlar. Apoptozis mekanizması immun

cevabı etkilemesiyle ve yangının şekillenmesi için oldukça önemlidir (Fink ve ark., 2005). Bu sebepten dolayı bu çalışmada *M. haemolytica* kökenli sığır mannheimiozisinin patogenezisinde epitel hücre apoptozisinin bir rolünün olup olmadığı belirlendi.

Apoptozisin belirlenmesinde günümüze kadar birçok yöntem bildirilmiştir. Bu yöntemler apoptozisi, çeşitli karakteristik özelliklerine göre ölçmektedir (Lacoeur, 2002; Mpoke ve Wolfe, 1997). Bu çalışmada epitel hücre apoptozisinin incelenmesi için apoptozisin karakteristik DNA fragmentasyonunu ölçen TUNEL ve DNA agaroz jel elektroforezi yöntemleri, bunun yanı sıra hücrelerde meydana gelen kromatin yoğunlaşmasını ölçen acridine orange-ethidium bromide boyama yöntemi kullanıldı. Çalışmada, test örnekleri ve kontrollerle yapılan incelemeler apoptozisi belirlemesi için kullanılan teknikler arasında farklılık olduğu belirlenmiş ve çalışmada kullanılan TUNEL yöntemi uygulanan epitel hücreler ve makrofajlardan elde edilen bulgular TUNEL yönteminin spesifik bir yöntem olduğunu göstermiştir. DNA fragmentasyonuna spesifik olan TUNEL yöntemi apoptozisin erken yada geç evresinde DNA da gerçekleşen kırıkları tanır ve böylece tek bir hücrede bile olsa meydana gelen apoptotik değişimi ölçebilir (Lacoeur, 2002). Çalışma bulgularıda bu kanıyı doğrular nitelikte olmuştur. Turbinata hücre kültüründe 600 hücre arasındaki 1 apoptotik hücre bile bu yöntemle belirlenebilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan diğer bir yöntem olan DNA agaroz jel elektroforezide DNA fragmentasyonunu ölçmek için kullanılmaktadır. Fakat bu yöntem hücre kültüründe meydana gelen apoptozisin miktarına bağlı olduğundan tek hücre bazında apoptozisi ölçemez. Stevens ve Czuprynski (1996), çalışmalarında, kromatin yoğunlaşmasına spesifik Hoescht 33342 boyama ile incelenmiş lökositlerin bu özelliği gösterdiği bulunmuştur. DNA fragmentasyonu ise DNA agaroz jel elektroforezi ile incelenmiş fakat bu yöntem için tipik olan DNA merdiveni görüntüsünü gözlemleyememişlerdir. Fakat Sun ve ark. (1999), çalışmalarında DNA fragmentasyonun ölçülmesinde hassas olan Difenilamin kolorimetrik testini ve DNA agaroz jel elektroforezini

kullamışlar ve her iki testte de DNA fragmentasyonunu gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada ise TUNEL testi bulguları ile DNA elektroforez bulguları birbirini destekler nitelikte olmuştur. Bu durumun makrofajlardaki apoptotik hücre miktarının fazla oluşundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Apoptozisin karakteristik kromatin yoğunlaşmasına dayanan diğer bir yöntem de bu çalışmada kullanılan acridine orange-ethidium bromide boyama yöntemidir (Lecoeur, 2002). Yöntem apoptotik hücreleri morfolojik olarak ölçmesi yönünden apoptozise duyarlı görünmektedir. Fakat bu çalışmada test örnekleri ve kontrollerle yapılan incelemelerde TUNEL yöntemi ve acridine orange-ethidium bromide boyama bulguları arasında farklılık olduğunu göstermiştir. Kontrol hücreleri olan makrofajlarla yapılan incelemelerde TUNEL testinde sayılan apoptotik hücre miktarı acridine orange-ethidium bromide boyama ile sayılan apoptotik hücre miktarından fazladır. Bu durum ise yöntemin TUNEL testi kadar duyarlı olmadığını düşündürmüştür. Ayrıca bu yöntemin TUNEL testinden daha kolay uygulanabilir olması bir avantajdır. Fakat bu yöntem değerlendirilken apoptotik hücrelerin normal hücrelerden ayrılmasında floresans parlama göz önüne alındığından, duyarlılığı konusunda şüpheye düşülmüştür. Sonuç olarak bu çalışmada TUNEL testinin diğer yöntemler arasında en duyarlı testlerden biri olduğu doğrulandı.

Diğer RTX toksinler gibi LKT'nin de yüksek konsantrasyonlarda hedef hücrelerin plazma membranlarında transmembran porlarının oluşumuna etki ederek onkozis olarak adlandırılan kolloid-osmotik hücre lizisine ve buna ek olarak, bazı RTX toksinleri gibi düşük konsantrasyonlarda hedef hücrelerde apoptozise neden olur (Sun ve ark., 1999). *M. haemolytica* LKT'nin yüksek konsantrasyon etkilerinin aksine, düşük konsantrasyonları sığır lökositlerinde çeşitli etkilere sebep olur. Bu etkiler oksidatif patlama, alveolar makrofajlar ve nötrofillerin degranülasyonu, lenfositlerin fonksiyonel zayıflaması, yangısal sitokin gen ekspresyonu, sitokin salgılanması ve apoptozisin hedef hücrelerde açık morfolojik, biyokimyasal ve moleküler değişimlerini kapsar ve mannheimiozisin patogenezinde oldukça önemlidir (Thumbikat ve ark. 2005).

Günümüze kadar yapılan çalışmaların çoğu LKT'nin hedef hücrelerdeki apoptotik etkilerine ilişkin olarak yapılmıştır. Birçok araştırmacı LKT'nin nötrofil, lökosit, lenfosit ve makrofaj faaliyetlerini bozma mekanizması üzerinde durmuşlar ve LKT'nin sığır nötrofil, lökosit, lenfosit ve makrofajlarında birçok etkiyi uyardığını saptamışlardır. Bu etkiler özellikle onkozis ve apoptozisi kapsamaktadır. Mevcut çalışmalarda hedef hücrelerde DNA fragmentasyonu ile karakterize apoptozisin genellikle konsantrasyon ve zaman bağımlı uyarıldığı sonucu çıkarılmıştır (Atapattu ve Czuprynski, 2005; Cudd ve ark., 2001; Stevens ve Czuprynski, 1996). Bu çalışmada, sadece LKT değil canlı *M. haemolytica* kültürünün epitel hücrelerde apoptotik etkileri gözlemlenmiş ve ayrıca karşılaştırma amacıyla LKT ve LPS içeren kaynatılmış tüm hücre araştırmada kullanılmıştır.

Bu çalışmada, TUNEL, DNA agaroz jel elektroforezi ve acridine orange-ethidium bromide boyama yöntemleri bulgularına göre canlı *M. haemolytica* kültürü, LKT ve kaynatılmış tüm hücre turbinata epitel hücrelerinde apoptozisi uyarmamıştır. Buna karşın kontrol olarak kullanılan makrofajlarda ise değişik oranlarda apoptozis görülmüştür. McClenahan ve ark. (2008) yaptığı çalışmada, LKT ve LPS ile muamele edilen epitel hücrelerde apoptozisle uyumlu belirtilere rastlanamamıştır. Bu bakımdan bulgular paralellik göstermektedir. Bu çalışmada, 18. saatte LKT ile muamele edilen turbinata epitel hücrelerinde az miktarda apoptotik hücreye rastlanmasının ise ya tamamen saf olmayan primer hücre kültürü kullanılmasından ya da 18. saatte hücre kültüründe normalde şekillenen apoptozisten kaynaklandığı düşünüldü.

Makrofajlarda apoptozis bulguları değerlendirildiğinde ise bu çalışmada canlı *M. haemolytica* kültürü ile yapılan deneysel inokulasyon sonrasında 0. saatte hücre kültüründe apoptotik hücre miktarı çok düşüktür. Bu durumun canlı *M. haemolytica* kültürünün makrofolara apoptotik uyarım yapmamasından ve az miktarda görülen apoptotik hücrelerin ise hücre kültüründe normal şartlarda şekillenen apoptozisten kaynaklanması ile

açıklandı. Bu duruma hem LKT ve hemde kaynatılmış tüm hücre ile deneysel olarak inokulasyon yapılmış makrofajlarda da rastlandı. Makrofajlarda 3. saatte canlı *M. haemolytica* kültürü ile yapılan deneysel inokulasyon sonrasında apoptotik hücre miktarında ciddi bir artış gözlemlendi ve bu artışın üremeden kaynaklanan bakteri artışı, ayrıca toksin üretimi ile ilişkili olduğu düşünüldü. Apoptotik hücre sayısındaki bu farkın sulandırma maddeleri arasında da belirdiği görüldü. Bu da günümüze kadar yapılan çeşitli çalışmalarla benzerlik göstermektedir (Sun ve ark., 1999; Sun ve ark., 2000; Stevens ve Czuprynski, 1996; Thumbikat ve ark., 2005). Buna rağmen 6. ve 18. saatlerde apoptotik hücre miktarlarında 3. saate göre fazla bir artış görülmemiştir. Ayrıca 6. ve 18. saatte sulandırma maddeleri arasında apoptotik hücre sayısında fazla bir farklılık da olmadı. Bu durumun üreme ile logaritmik fazı geride bırakan bakteri popülasyonunun eşitlenmesinden kaynaklandığı düşünüldü. Sonuç olarak bu durumlar canlı *M. haemolytica* kültürünün makrofajlardaki apoptotik uyarımının belirli oranlarda zaman ve doz bağımlı olduğunu göstermiştir.

Sun ve ark. (1999), *Mannheimia haemolytica* lökotosininin sığır lökositlerinde induklediği apoptozisin DNA fragmentasyonu yönünden inceledikleri çalışmalarında, lökotosinin düşük konsantrasyonlarının sığır lökositlerinde konsantrasyon ve zaman bağımlı olarak apoptozisi uyardığını ve ayrıca apoptozisin miktarının en yüksek görüldüğü zamanın deneysel inokülasyonun 3. saati olduğunu bildirmişlerdir. Sun ve ark. (2000), *Mannheimia haemolytica* lökotosinine maruz kalan lenfositlerde apoptozisin ultra yapısal karakterizasyonunu inceledikleri diğer çalışmalarında ise düşük lökotosin konsantrasyonlarında lenfositlerin %80'nin de DNA fragmentasyonunun görüldüğünü ve ayrıca nükleer membran şişmesi, sitoplazmik vakuolasyon, kromatin yoğunlaşması ve membranına bağlı apoptotik cisimciklerin görüldüğünü saptamışlardır. Aynı çalışmada bu bulguların görülebilmesi için 3 saatin yeterli olacağını ve LKT'nin çok düşük konsantrasyonlarının da apoptotik hücre ölümünü uyardığını açıklamışlardır. Bu çalışmada LKT ile yapılan deneysel inokulasyon sonrasında makrofajlarda apoptotik hücre sayısının en yüksek olduğu zaman

deneysel inokulasyonun 3. saati olarak bulundu, 6. ve 18. saatlerde ise apoptotik hücre sayılarında fazla bir değişiklik görülmedi. Ayrıca bu çalışmada LKT'nin çok düşük konsantrasyonda makrofajlarda apoptozisi uyarmadığı görüldü. Bu bulgular da diğer çalışmalarla paralellik gösterdi. Cudd ve ark. (2001), sığır nötrofillerinin apoptozisi ve onkozisi üzerinde *Mannheimia haemolytica* lökotosininin etkilerini inceledikleri çalışmalarında, *Mannheimia haemolytica* lökotosininin etkilerinin doz ve zaman bağımlı olduğunu, LKT'nin düşük konsantrasyonunun nötrofil apoptozisine, daha yüksek konsantrasyonlarının ise nötrofil onkozisine sebep olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise 10^{-1} LKT sulandırmasında makrofajlarda apoptotik hücre sayısı en yüksektir. Bu açıdan Cudd ve ark. (2001)'nin çalışmalarından bu araştırma ayrılıyor gibi görünmektedir. Fakat bu durumun, araştırmada kullanılan toksin stoğunun toksin içeriğinin az miktarda olmasından kaynaklabileceği düşünülmüştür.

McClenahan ve ark. (2008) hem LPS hemde LKT (lökotosin)'nin sığır mikrovasküler endotel ve alveolar epitel hücrelerinde permeabilite, morfoloji ve apoptozis seviyelerinde etkilerini inceledikleri çalışmalarında LPS'nin endotelyal hücrelerde apoptotik etkileri sahip olduğunu fakat epitel hücrelerde bu etkinin görülmediğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, sığır pulmoner epitel (BPE) ve sığır akciğer mikrovasküler endotel hücreleri hedef hücre olarak kullanmışlar ve çalışmada LPS'ye maruz kalan endotel hücrelerinde yangısal sitokinlerin artması, apoptozis ve hücre tabakalarında fazla miktarda azalma olduğunu gözlemişlerdir. Buna karşın LPS'ye maruz kalan epitel hücrelerinde yangısal sitokinlerin arttığı fakat apoptozis ve anlamlı morfolojik değişimlerin meydana gelmediğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise kaynatılmış tüm hücre ile yapılan deneysel inokulasyon sonrasında makrofajlarda apoptotik hücre sayısının 18. saatte en yüksek değerde olduğu bulundu ve sulandırmalara göre apoptotik hücre sayılarında değişiklik görüldü. Turbinata epitel hücrelerinde McClenahan ve ark. (2008)'nin yaptığı çalışma ile paralel olarak apoptozis görülmedi ve araştırmacıların bulgularından farklı olarak bu çalışmada kaynatılmış tüm hücreye maruz kalan hem turbinata epitel

hücreleri ve hemde makrofajlarda hücre tabakalarında belirgin bir değişikliğe rastlanmadı.

Bu çalışmada, turbinata epitel hücrelerinde, canlı *M. haemolytica* kültürü, LKT ve kaynatılmış tüm hücre ile yapılan deneysel inokülasyon sonrasında apoptotik uyarımın görülmemesinin sebebinin anlaşılması açısından LKT spesifik reseptörler CD18 ve CD11a, LPS spesifik reseptör TLR-4 reverse transkriptaz-plimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile incelendi. Yapılan incelemelerde turbinata hücrelerinde bu reseptörlerin hiçbirine rastlanamaması ve bu sebeple *M. haemolytica*'nın en önemli virulens faktörleri olan LKT ve LPS'nin bu hücrelere etkisini gösterememesi, neden bu hücrelerde apoptozisin görülmediğinede açıklık getirmiştir. McClenahan ve ark. (2008)'nin çalışmaları da epitel hücrelerinde bu reseptörler bulunamamış buna karşın lökositlerde bu reseptörlerin varlığı bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada yapılan incelemeler sonucunda lökositlerde bu moleküllerin varlığı bulunmuş ve makrofajlardaki apoptotik etkinin sebebinin bu reseptörlerin bulunuşu ile ilişkili olduğu görülmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

M. haemolytica'nın sığır epitel hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmada aşağıda belirtilen sonuçlara varıldı.

Apoptozisi belirlemede çalışmada, kullanılan yöntemler arasında farklılık bulunduğu, TUNEL yönteminin apoptotik hücreleri belirlemede geçerli ve güvenilir bir yöntem olduğu kullanılan kontroller ile anlaşıldı.

Canlı *M. haemolytica* kültürü ve LKT'nin alveolar makrofajlar üzerinde ciddi oranda apoptotik etki gösterdiği, fakat kaynatılmış tüm hücrenin apoptotik uyarımının LKT ve canlı *M. haemolytica* kültürüne oranla daha düşük olduğu belirlendi. Pnömonik mannheimiozisin patogeneğinde, alveolar makrofaj apoptozisinin rolü ve apoptozisin zaman ve doz bağımlı olduğu bir kez daha desteklendi. Ayrıca çalışmada LKT'nin çok düşük konsantrasyonlarında makrofajlar üzerinde apoptotik uyarım yapmadığı ve bu etkinin görülebilmesi için bir eşik değeri olduğu anlaşıldı. Bununla birlikte, *M. haemolytica* ile yapılan ve farklı hücrelerin kullanıldığı çalışmalarda alveolar makrofajlar pozitif kontrol hücresi olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu da düşünüldü.

Canlı *M. haemolytica* kültürü, LKT ve kaynatılmış tüm hücrenin turbinata epitel hücrelerinde apoptotik ve sitotoksik etkisinin olmadığı anlaşıldı. Bunun sebebinin ise bu hücrelerde LKT spesifik CD18/CD11a ve LPS spesifik TLR-4 reseptörlerinin bulunmaması sonucu canlı *M. haemolytica* kültürü, LKT ve LPS'nin bu hücrelere etki edememiş olmasından kaynaklandığı düşünüldü. Ayrıca test bulgularında görülen sapmaların ise kullanılan primer hücre kültürünün miks yapıda olmasında kaynaklanabileceği düşünüldü ve daha sonra yapılacak olan çalışmalarda kullanılan hücre kültürünün saf olması gerekliliği anlaşıldı.

Tüm bu bulgular pnömonik mannheimiozisin patogenezinde, epitel hücre apoptozisinin rolü olmadığını gösterdi.

ÖZET

***Mannheimia haemolytica*'nın Sığır Epitel Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisi**

Bu çalışmada, *Mannheimia haemolytica*'nın sığır epitel hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin belirlenmesi ve sığır mannheimiozisinin patogeneğinde epitel hücre apoptozisinin bir rolü olup olmadığının araştırılması amaçlandı. Bunun için apoptotik DNA fargmentasyonunun belirlenmesi amacıyla TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase nick end labeling) testi, DNA agaroz jel elektroforezi ve Acridine orange-Ethidium Bromide boyama yöntemleri kullanıldı.

Çalışmada, sığır nazal turbinata epitel hücreleri ve alveolar makrofajlar canlı *M. haemolytica* kültürü, *M. haemolytica*'nın lökotoksini (LKT) ve *M. haemolytica*'nın kaynatılmış tüm hücre sulandırması ile 0, 3, 6, ve 18 saat olmak üzere zaman ve doz bağımlı şekilde muamele edilerek incelendi. TUNEL testi tüm zaman ve sulandırmalarda, DNA agaroz jel elektroforezi ve Acridine orange-Ethidium bromide boyama ise 18. saatte tüm sulandırmalarda değerlendirildi.

Değerlendirmeye göre TUNEL testinde canlı *M. haemolytica* kültürü LKT ve kaynatılmış tüm hücre tüm sulandırılmalarda ve tüm zamanlarda turbinata hücrelerinde apoptozisi uyarmadı. DNA agaroz jel elektroforezinde turbinata hücrelerinde DNA merdiveni gözlenmedi ve Acridine orange-Ethidium bromide boyamada da 18. saatte apoptotik hücelere rastlanmadı. Makrofajlarda ise TUNEL testinde 0. saat dışında tüm zaman ve tüm sulandırmalarda apoptotik değişimlere rastlandı. Bu bulgular, DNA agaroz jel elektroforezi ve Acridine orange-Ethidium bromide boyama ile desteklendi.

Sunulan çalışmada, canlı *M. haemolytica* kültürü, LKT ve kaynatılmış tüm hücrenin sığır epitel hücrelerinde apoptozisi indüklemeye potansiyeline sahip olmadığı fakat makrofajlarda apoptozisi indüklediği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: *Mannheimia haemolytica*, Apoptozis, Sığır, Epitel hücresi

SUMMARY

Apoptotic Effect of *Mannheimia haemolytica* on Bovine Epithelial Cells

In this study, it is aimed that whether *Mannheimia haemolytica* has an apoptotic effect or not on bovine epithelial cells and whether epithelial cells apoptosis have a role or not in patogenesis of bovine mannheimiosis. To detect bacteria-induced apoptosis, TUNEL (TdT-mediated dUTP-X nick end labeling), DNA gel electrophoresis and acridine orange-ethidium bromide staining methods were used.

Cultured bovine nasal turbinate cells and alveolar macrophages were treated with serial dilutions of live *M. haemolytica*, *M. haemolytica* leukotoxin (LKT) and boiled *M. haemolytica* in a time-dependent manner between zero and 18th hours. TUNEL method was applied to all dilutions at all time intervals, DNA gel electrophoresis and acridine orange-ethidium bromide staining to all dilutions at 18th hour.

In TUNEL method, live *M. haemolytica*, LKT and boiled whole cells of *M. haemolytica* were not found to induce apoptosis in bovine turbinate cells. While TUNEL method revealed the apoptosis in conditions indicated above, apoptosis could not be detected with DNA gel electrophoresis and acridine orange-ethidium bromide staining method. Macrophages treated with live *M. haemolytica* had apoptotic changes at all time intervals except of zero time. This findings were supported by DNA gel electrophoresis and acridine orange-ethidium bromide staining method.

It was suggested that live cells of *M. haemolytica*, LKT and boiled whole cells of *M. haemolytica* have not the potential to induce varying degrees of apoptosis in bovine epithelial cells, but they have such an effect on macrophages.

Key Words: *Mannheimia haemolytica*, Apoptosis, Cattle, Epithelial cell

KAYNAKLAR

- AL-GHAMDI, G., M., AMES, T., R., BALKER, J., C., WALKER, R., CHASEC., L., FRANK, G., H., MAHESWARAN, S., K. (2000). Serotyping of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* isolates from the upper Midwest United States. *J. Vet. Diagn. Invest.* **12**: 576-578
- ATAPATTU, D., N., CZUPRYNSKI, C., J. (2005) *Mannheimia haemolytica* Leukotoxin Induces Apoptosis of Bovine Lymphoblastoid Cells (BL-3) via a Caspase-9- Dependent Mitochondrial Pathway. *Infect. Immun* **73**: 5504-5513
- AYALEW S., CONFER A. W., BLACKWOOD E. R (2004). Characterization of Immunodominant and Potentially Protective Epitopes of *Mannheimia haemolytica* Serotype 1 Outer Membrane Lipoprotein PlpE. *Infect. Immun.* **72**: 7265-7274
- AYDIN, N. (2006). *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Haemophilus* ve *Actinobacillus* Enfeksiyonları. In: Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar), Ed: AYDIN, N., PARACIKOĞLU, J. Ankara: İlke-Emek yayınları, p: 171-193.
- BIBERSTEIN E. L., GILLS M., KNIGHT H. (1960). Serological types of *Pasteurella haemolytica*. *Cornell Vet.* **50**:283-300
- CARTY, B. (2005). *Pasteurella* and *Mannheimia* species from calves: differentiation antimicrobial resistance, PhD thesis, Ghent University, Merelbeke, Belgium.
- CATES, E., A., CONNOR, E., E., MOSSER, D., M., BANNERMAN, B., B. (2008). Functional characterization of bovine TIRAP and MyD88 in mediating bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial NF- κ B activation and apoptosis. Erişim: [http://www.sciencedirect.com/science?_ob=Article] Erişim Tarihi: 27.09.2008
- CUDD L. A., OWNBY C. L., CLARKE C. R., SUN Y., CLICKENBEARD K. D.(2001). Effects of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin on apoptosis and oncosis of bovine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.* **62**: 136-141
- DAVIES R. L., LEE I.(2004). Sequence Diversity and Molecular Evolution of the Heat- Modifiable Outer Membrane Protein Gene (*ompA*) of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*, *Mannheimia glucosida*, and *Pasteurella trehalosi*. *J.Bacteriol.* **186**: 5741-5752
- DAVIES R. L., WHITTAM, T.,S., SELANDER, R., K. (2001). Sequence Diversity and Molecular Evolution of the Leukotoxin (*lktA*) Gene in Bovine and Ovine Strains of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*. *J Bacteriol.* **183**: 1394-1404
- DİKER K. S., KAYA O., AKAN M. (1995). Koyun pnömonik *Pasteurella* enfeksiyonlarına karşı aşı geliştirme çalışmaları. TÜBİTAK Proje No: VHAG-997, Ankara, 1995, s.51
- DOCKRELL, D. H. (2001). Apoptotic Cell Death in the Pathogenesis of Infectious Diseases. *J. Infect.* **42**: 227-234
- FEDOROVA, D., N., HIGHLANDER, S., K. (1997). Generation of Targeted Nonpolar Gene Insertions and Operon Fusions in *Pasteurella haemolytica* and Creation of a Strain That Produces and Secretes Inactive Leukotoxin. *Infect. Immun.* **65**: 2593-2598
- FINK S. L., COOKSON B. T. (2005). Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infect. Immun.* **73**: 1907-1916

- FISHER M. A., WEISER G. C., HUNTER D. L., WARD A. C. S. (1999). Use of a polymerase chain reaction method to detect the leukotoxin gene *lktA* in biogroup and biovariant isolates of *Pasteurella haemolytica* and *P. trehalosi*. *Am. J. Vet. Res.* **60**: 1402-1406
- GAO, L. Y., KWAİK, Y. A. (2000). The Modulation of Host Cell Apoptosis by Intracellular Bacterial Pathogens. *Trends Microbiol.* **8**: 306-313
- GATEWOOD, D., M., FENWICK, B., W., CHENGAPPA, M., M. (1994). Growth condition dependent expression of *Pasteurella haemolytica* A1 outer membrane proteins, capsule, and leukotoxin. *Vet. Microbiol.* **41**: 221-33
- GOHEL, A., MCCARTHY, M., GRONOWICZ, G. (1999). Estrogen Prevents Glucocorticoid-Induced Apoptosis in Osteoblasts *in Vivo* and *in Vitro*. *Endocrinology.* **140**: 5339-5347
- HIGHLANDER, S., K., FEDOROVA, D., N., DUSEK, D., M., PANCIERRA, R., ALVAREZ, L., E., RINEHARD, C. (2000). Inactivation of *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* Leukotoxin Causes Partial Attenuation of Virulence in a Calf Challenge Model. *Infect. Immun.* **68**: 3916-3922
- JARAMILLO L., DIAZ F., HERNANDEZ P., DEBRAY H., TRIGO F., MENDOZA G., ZENTENO E. (2000). Purification and characterization of an adhesin from *Pasteurella haemolytica*. *Glycobiology.* **10**: 31-37
- JEYASEELAN S., HSUAN, S., L., KANHAN, M., S., WALCHECK, B., WANG, J., F., KEHRLI, M., E., LALLY, E., T., SIECK, G., C., MAHESWARAN S. K. (2000). Lymphocyte Function-Associated Antigen 1 Is a Receptor for *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin in Bovine Leukocytes. *Infect. Immun.* **68**: 72-79
- JEYASEELAN S., SREEVATSAN S., MAHESWARAN S. K. (2002). Role of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. *Anim. Health Res. Rev.* **3**: 69- 82
- JONES, N. L., ISLUR, A., HAQ, R., MASCARENHAS, M., KARMALI, M. A., PERDUE, M., ZANKE, B. W., SHERMAN, P. M. (2000). Escherichia coli Shiga Toxins Induce Apoptosis in Epithelial Cells that is Regulated by the Bcl-2 Family. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* **278**: 811-819
- KOROSTOFF J., WANG J. F., KIEBA I., MILLER M., SHENKER B. J., LALLY E. T. (1998). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Leukotoxin Induces Apoptosis in HL-60 Cells. *Infect. Immun.* **66**: 4474-4483
- LACROIX R. P., DUNCAN J. R., JENKINS R. P., LEITCH R. A., PERRY J. A., RICHARDS J. C. (1993). Structural and Serological Specificities of *Pasteurella haemolytica* Lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* **61**: 170-181
- LAFLEUR R. L., MALAZDREWICH C., JEYASEELAN S., BLEIFIELD E., ABRAHAM M. S., MAHESWARAN S. K. (2001). Lipopolysaccharide enhances cytolysis and inflammatory cytokine induction in bovine alveolar macrophages exposed to *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin. *Microb. Pathog.* **30**: 347-357
- LAZEBNIK, Y. (2001). Why do Regulators of Apoptosis look like Bacterial Toxins? *Curr. Biol.* **11**: 733-734
- LECOEUR, H. (2002). Nuclear Apoptosis Detection by Flow Cytometry: Influence of Endogenous Endonucleases. *Exp. Cell Res.* **277**: 1-14
- LEITE F., GYLES S., ATAPATTU T., MAHESWARAN S. K., CZUPRYNSKI C. Z. (2003). Prior exposure to *Mannheimia haemolytica* leukotoxin or LPS enhances β 2-integrin expression by bovine neutrophils and augments LKT cytotoxicity. *Microb. Pathog.* **34**: 267- 275
- LEITE, F., MALAZDREWICH, C., YOO, H., S., MAHESWARAN, S., K., CZUPRYNSKI, C., J. (1999). Use of TUNEL staining to detect apoptotic

- cells in the lungs of cattle experimentally infected with *Pasteurella haemolytica*. *Microb. Pathog.* **27**: 179-185
- LI J., CLINKENBEARD K. D. (1999). Lipopolysaccharide Complexes with *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin. *Infect. Immun.* **67**: 2920-2927
- MAHASRESHTI P. J., MURPHY G. L., WYCKOFF III J. H., FARMER S., HANCOCK R. E. W., CONFER A. W. (1997). Purification and Partial Characterization of the OmpA Family of Proteins of *Pasteurella haemolytica*. *Infect. Immun.* **65**: 211-218
- MALAZDREWICH C., THUMBIKAT P., ABRAHAMSEN M. S., MAHESWARAN S. K. (2004). Pharmacological inhibition of *Mannheimia haemolytica* lipopolysaccharide and leukotoxin-induced cytokine expression in bovine alveolar macrophages. *Microb. Pathog.* **36**: 159-169
- McCLENAHAN D., HELLENBRAND K., ATAPATTU K., AULIK N., CARLTON D., KAPUR A., CZUPRYNSKI C. (2008). Effects of Lipopolysaccharide and *Mannheimia haemolytica* Leukotoxin on Bovine Lung Microvascular Endothelial Cells and Alveolar Epithelial Cells. *Clin. Vaccine. Immunol.* **15**: 338-347
- MCKERRAL, L. J., REGGIE, Y., C. (2002). Construction and Characterization of an Acapsular Mutant of *Mannheimia haemolytica* A1. *Infect. Immun.* **70**: 2622-2629
- MENAKER, R. J., JONES, N. L. (2003). Fascination with Bacteria-triggered Cell Death: The Significance of Fas-mediated Apoptosis during Bacterial Infection in vivo. *Microbes Infect.* **5**: 1149-1158
- MENAKER, R., J., CEPONIS, P., J., M., JONES, N., L. (2004) *Helicobacter pylori* Induces Apoptosis of Macrophages in Association with Alterations in the Mitochondrial Pathway. *Infect. Immun.* **72**: 2889-2898
- MPOKE, S., S., WOLFE, J. (1997). Differential Staining of Apoptotic Nuclei in Living Cells: Application to Macronuclear Elimination in *Tetrahymena*. *J. Histochem. Cytochem.* **45**: 675-683
- MULLER, A., RUDEL, T. (2001). Modification of Host Cell Apoptosis by Viral and Bacterial Pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**: 197-207
- MURPHY G. L., WHITWORT L. C., CLICKENBEARD K. D., CLICKENBEARD P. A. (1995). Hemolytic Activity of the *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin. *Infect. Immun.* **63**: 3209- 3212
- ÖNİZ, H. (2004). Apoptoz: Ölmeye Yatmak. SSK Tepecik Hast. Derg. **14**: 1-20
- PANDHER, K., CONFER, A., W., MURPHY, G., L. (1998). Genetic and Immunologic Analyses of PlpE, a Lipoprotein Important in Complement-Mediated Killing of *Pasteurella haemolytica* Serotype 1. *Infect. Immun* **66**: 5613-5619
- PERL M., CHUNG C. S., AYALA A. (2005). Apoptosis. *Crit. Care. Med.* **33**: 526-529
- PREEZ J. C., RENSBURG E., KILIAN S. G. (2008). Kinetics of growth and leukotoxin production by *Mannheimia haemolytica* in continuous culture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 611-8
- PURDY, C., W., RALEIGH, R., H., COLLINS, J., K., WATTS, J., L., STRAUS, D., C. (1997) Serotyping and Enzyme Characterization of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* Isolates Recovered from Pneumonic Lungs of Stressed Feeder Calves. *Curr. Microbiol.* **34**: 244-249
- QUIN, P., J., CARTER, M., E., MARKEY, B., CARTER, G., R. (1999). Clinical Veterinary Microbiology. Elsevier Health Sciences p:254-259

- REEKS B. Y., CHAMPLIN F. R., PAULSEN D. B., SCRUGGS D. W., LAWRENCE M. L. (2005). Effects of sub-minimum inhibitory concentration antibiotic levels and temperature on growth kinetics and outer membrane protein expression in *Mannheimia haemolytica* and *Haemophilus somnus*. *Can. J. Vet. Res.* **69**: 1-10
- REGGIE Y. C. L. (2001) Genetic analysis of virulence factors of *Mannheimia haemolytica* A1. *Vet. Microbiol.* **83**: 23-35
- REGGIE Y. C. L., McKERRAL L. J., HILLS T. L., KOSTRZYNSKA M. (2001). Analysis of the Capsule Biosynthetic Locus of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1 and Proposal of a Nomenclature System. *Infect. Immun* **69**: 4458- 4464.
- RICE J. A., CARRASCO- MEDINA L., HODGINS D. C., SHEWEN P. E. (2008). *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. *Anim. Health. Res. Rev.* **8**: 117- 128
- SAMBROOK, J., RUSSELL, D., W. (2001). Molecular Cloning A Laboratory Manual. Thirt Edition Cold Spring Harbor, New York. Vol. I Chepter 7 p: 7.4-7.8
- SMITH G.R. (1961). The Characteristics of Two Types of *Pasteurella haemolytica* associated with Different Phatological conditions in sheep. *J. Pathol. Bacteriol.* **81**:431-439
- SRIKUMARAN S., KELLING C. L., AMBAGALA A. (2008). Immune evasion by pathogens of bovine respiratory disease complex *Anim. Health. Res. Rev.* **8**: 215-229
- STEVENS, P., K., CZUPRYNSKI, C., J (1996). *Pasteuralla haemolytica* Leukotoxin Induces Bovine Leukocytes To Undergo Morphologic Changes Consistent with Apoptosis In Vitro. *Infect. Immun.* **64**: 2687-2694
- STRATHDEE, C., A., LO, R., Y., C. (1987). Extensive Homology between the Leukotoxin of *Pasteurella haemolytica* A1 and the Alpha-Hemolysin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **55**: 3233-3236
- STRAUS D. C., JOLLEY W. L., PURDY C. W. (1993). Characterization of Neuraminidases Produced by Various Serotypes of *Pasteurella haemolytica*. *Infect. Immun.* **61**: 4669-4674
- STRAUS D. C., PUDRY C. W., LOAN R. W., BRIGGS R. F., FRANK G. H. (1998). In Vivo Production of Neuraminidase by *Pasteurella haemolytica* in Market Stressed Cattle After Natural Infection. *Curr. Microbiol.* **37**: 240-244
- SUN, Y., CLINKENBEARD, K., D., CLARKE, C., CUDD, L., HIGHLANDER, K. S. (1999). *Pasteuralla haemolytica* Leukotoxin of bovine lymphocytes involves DNA fragmentation. *Vet. Microbiol.* **65**: 153-166
- SUN, Y., CLINKENBEARD, K., D., OWNBY, L., C., CUDD, L., CLARKE R., C., HIGHLANDER, S., K. (2000). Ultrastructural characterization of apoptosis in bovine lymphocytes exposed to *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Am. J. Vet. Res.* **61**: 51-56
- THUMBIKAT, P., DILEEPAN, T., KANNAN, S., MAHESWARAN, S., K. (2005) Mechanisms underlying *Mannheimia haemolytica* leukotoxin-induced oncosis and apoptosis of bovine alveolar macrophages. *Microb. Pathog.* **38**: 161-172
- TOMATIR, A. G. (2003). Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *T. Klin. Tıp Bilimleri* **23**: 499-508
- WANG, J., F., KIEBA, R., I., KOROSTOFF, J., GUO, T., L., YAMAGUCHI, N., ROZMIAREK, H., BILLINGS, C., P., SHENKER, J., B., LALLY, E., T. (1998). Molecular and biochemical mechanisms of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin- induced cell death. *Microb. Pathog.* **25**: 317-331

- WEINRAUCH, Y., ZYCHLISKY, A. (1999). The Induction of Apoptosis by Bacterial Pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**: 155-187
- WHITE D. J., JOLLEY W. L., PURDY C. W., STRAUS D. C. (1995). Extracellular Neuraminidase Production by a *Pasteurella multocida* A:3 Strain Associated with Bovine Pneumonia. *Infect. Immun.* **63**: 1703-1709
- WHITELEY, L., O., MAHESWARAN, S., K., WEISS, D., J., AMES, T., R., (1990). Immunohistochemical localization of *Pasteurella haemolytica* A1-derived endotoxin, leukotoxin, and capsular polysaccharide in experimental bovine *Pasteurella pneumonia*. *Vet. Pathol.* **27**: 150-61
- WINN W., ALLEN S., JANDA W., KONEMAN E., PROCOP G., SCHRECKENBERGER P., WOODS G. (2006). Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. (6. Edition). Lippincott Williams & Wilkins. Chapter 8. p: 459-467
- YOO H. S., MAHESWARAN S. K., LIN G., TOWNSEND E. L., AMES T. R. (1995). Induction of Inflammatory Cytokines in Bovine Alveolar Macrophages following Stimulation with *Pasteurella haemolytica* Lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* **63**: 381-388
- ZECHINON L., FETT T., DESMECHT D.(2005). How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. *Vet. Res.* **36**: 133-156
- ZYCHLISKY, A., SANSONETTI, P. (1997a). Apoptosis as a Proinflammatory Event: What can we learn from Bacteria-induced Cell Death? *Trends Microbiol.* **5** : 201-204
- ZYCHLISKY, A., SANSONETTI, P. (1997b). Apoptosis in Bacterial Pathogenesis. *J. Clin. Invest.* **100**: 493-496

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Ebru
Soyadı : Yavrucu
Doğum yeri ve tarihi : Ankara, 03.11.1982
Uyruğu : TC
Medeni durumu : Bekar
İletişim adresi ve telefonu :1. Cadde 77/12 Demetevler / Ankara
312 3355335

II- Eğitimi

2005-2008 AÜ. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji A.B.D. Yüksek Lisans
2000-2004 AÜ. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
1996-2000 Ankara Anıttepe Lisesi
1993-1996 Amasya.Merzifon Cumhuriyet Ortaokulu
1987-1993 Amasya.Merzifon.Mehmetçik İlköğretim Okulu
Yabancı Dili İngilizce

III- Ünvanları

Biyolog

IV- Mesleki Deneyimi

2005 yılından itibaren A.Ü. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji A.B.D.
Yüksek Lisans öğrencisi

V- Bilimsel Etkinlikleri

Seminerler
1.Bakteriyel Apoptozis (2006)