



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

**LİSTERİOZİS İLE DOĞAL ENFEKTE KOYUN
BEYİNLERİNDE MAST HÜCRELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Süleyman ŞENER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Volkan İPEK**

BURDUR-2021

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

**LİSTERİOZİS İLE DOĞAL ENFEKTE KOYUN
BEYİNLERİNDE MAST HÜCRELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Süleyman ŞENER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Volkan İPEK

Bu araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 0643-YL-20 proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR-2021

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince beni sürekli yönlendiren, tez konumun oluşturulmasından yazımına kadar her aşamasında bilgi birikimini, tecrübe ve görüşlerini esirgemeyen danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Volkan İPEK'e,

Araştırmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve tecrübelerini paylaşarak yön veren Patoloji Ana Bilim Dalı'ndaki Hocalarım ve değerli Arkadaşlarıma, eğitim hayatım boyunca tüm kararlarımda her zaman arkamda olan ve desteklerini eksik etmeyen Aileme, değerli arkadaşım Veteriner Hekim Onur SAVAŞ'a, her zaman arkamda duran, kararlarıma saygı duyan ve daima destekleyen hayat arkadaşım Merve ÇÖKEN'e teşekkürlerimi sunarım.

**Veteriner Hekim
Süleyman ŞENER**

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	<i>i</i>
KABUL ONAY	<i>ii</i>
TEŞEKKÜR	<i>iii</i>
BEYAN	<i>iv</i>
İÇİNDEKİLER	<i>v</i>
ŞEKİLLER	<i>vi</i>
TABLolar	<i>viii</i>
SİMGELER VE KISALTMALAR	<i>ix</i>
ÖZET	<i>x</i>
ABSTRACT	<i>xi</i>
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Listeria'nın Morfolojisi ve Büyüme Özellikleri	3
2.2. Epidemiyoloji	3
2.3. Listeria'nın Patogenezi	5
2.4. Klinik Bulgular	7
2.4.1. Septisemik Form	7
2.4.2. Ensefalitik Form	8
2.4.3. Abortif Form	9
2.5. Nekropsi Bulguları	9
2.6. Mikroskopik Bulgular	10
2.7. Mast Hücreleri ve Listeriozis'te Roller	10
3. GEREÇ ve YÖNTEM	13
4. BULGULAR	16
4.1 Histopatolojik Bulgular	16
4.2 Histokimyasal ve İmmunohistokimyasal Bulgular	20
5. TARTIŞMA	32
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	36
KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ	47

ŞEKİLLER

Sayfa		
Şekil 4.1.	Çok sayıda ve beyin parankiminin büyük bölümünü kapsayan mikroapse oluşumları. H&E. Bar: 100 µm.	16
Şekil 4.2.	Birden fazla odakta gözlenen ve yer yer birleşme eğiliminde mikroapse oluşumları. H&E. Bar: 100 µm.	17
Şekil 4.3.	Birkaç odakta gözlenen mikroapse oluşumları ve nöropile dağılmış durumda yangısal hücre infiltrasyonları. H&E. Bar: 100 µm.	17
Şekil 4.4.	Tek bir odakta gözlenen mikroapse oluşumu. H&E. Bar: 100 µm.	18
Şekil 4.5.	Şiddetli perivasküler hücre infiltrasyonları. H&E. Bar: 100 µm.	18
Şekil 4.6.	Orta şiddette perivasküler hücre infiltrasyonu. H&E. Bar: 100 µm.	19
Şekil 4.7.	Hafif şiddette perivasküler hücre infiltrasyonu. H&E. Bar: 50 µm.	19
Şekil 4.8.	Çok hafif şiddette perivasküler hücre infiltrasyonu. H&E. Bar: 100 µm.	20
Şekil 4.9.	Pozitif kontrol. Köpek mast hücre tümöründe çok sayıda mast hücresi. Toluidine Blue. Bar: 20 µm.	21
Şekil 4.10.	Pozitif kontrol. Köpek dermal mast hücre tümöründe çok sayıda triptaz pozitif mast hücreleri. Avidin-biotin kompleks metot. DAB kromojen. Bar: 50 µm.	21
Şekil 4.11.	Şiddetli enfekte beyin dokusunda perivasküler hücre infiltrasyonları arasında gözlenen çok sayıda mast hücresi. Toluidine blue. Bar: 20 µm.	22
Şekil 4.12.	Orta derecede enfekte beyin dokusunda perivasküler yerleşimli mast hücreleri. Toluidine Blue. Bar: 20 µm.	22
Şekil 4.13.	Hafif şiddette enfekte beyin dokusunda perivasküler yerleşimli mast hücresi. Toluidine Blue. Bar: 20 µm.	23
Şekil 4.14.	Şiddetli enfekte beyin dokusunda çok sayıda Triptaz pozitif mast hücreleri. Avidin-biotin kompleks metot. DAB kromojen. Bar: 20 µm.	23
Şekil 4.15.	Orta şiddette enfekte beyin dokusunda triptaz pozitif mast hücreleri. Avidin-biotin kompleks metot. DAB kromojen. Bar: 20 µm.	24
Şekil 4.16.	Hafif şiddette enfekte beyin dokusunda triptaz pozitif mast hücresi. Avidin-biotin kompleks metot. DAB kromojen. Bar: 20 µm.	24
Şekil 4.17.	Normal beyin dokusunda perivasküler yerleşimli mast hücresi. Toluidine Blue. Bar: 20 µm.	25
Şekil 4.18.	Normal beyin dokusunda triptaz pozitif mast hücresi. Avidin-biotin kompleks metot. DAB kromojen. Bar: 20 µm.	25
Şekil 4.19.	Yoğun anti-Listeria antijen pozitifliği. Avidin-biotin kompleks metot. DAB kromojen. Bar: 100 µm.	27
Şekil 4.20.	Yoğun anti-Listeria antijen pozitifliği. Avidin-biotin kompleks metot. DAB kromojen. Bar: 20 µm.	27
Şekil 4.21.	Orta şiddette anti-Listeria antijen pozitifliği. Avidin-biotin kompleks metot. DAB kromojen. Bar: 50 µm.	28

- Şekil 4.22.** Orta şiddette anti-Listeria antijen pozitifliği. Avidin-biotin kompleks metot. DAB kromojen. Bar: 20 µm. **28**
- Şekil 4.23.** Hafif dereceli anti-Listeria antijen pozitifliği. Avidin-biotin kompleks metot. DAB kromojen. Bar: 20 µm. **29**
- Şekil 4.24.** Çok hafif dereceli anti-Listeria antijen pozitifliği. Avidin-biotin kompleks metot. DAB kromojen. Bar: 20 µm. **29**



TABLÖLAR

Tablo 3.1.	Çalışmada Kullanılan Kontrol Grubu ve Listeria Grubu Vakalara Ait Bilgiler	13
Tablo 4.1.	Lezyonlara ait skor tablosu	26
Tablo 4.2.	Pearson korelasyon testi sonuçları	30
Tablo 4.3.	Baskın hücreler arası ve kontrol/enfekte gruplar arası istatistiksel karşılaştırma	31



SİMGELER VE KISALTMALAR

BOS:	Beyin Omurilik Sıvısı
DAB:	Diaminobenzidin
LLO:	Listeriolizin O
MCET:	Mast Hücre Hücresi Dışı Tuzağı
MCETs:	Mast Hücre Ekstraselüler Tuzakları
NADPH:	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat Hidrojen
PBS:	Fosfat Tampon Solüsyonu
PRR:	Kalıp Tanıma Reseptörleri
TB:	Toluidine Blue

ÖZET

Listeriozis ile Doğal Enfekte Koyun Beyinlerinde Mast Hücrelerinin Araştırılması

Listeria monocytogenes, Listeriozis'e sebep olan ciddi ve hayatı tehdit edici zoonotik bir hastalıktır. Listeriozis ruminantlarda abortus, meningoensefalitis ve yeni doğanlarda septisemi ile seyreder. Beyinde bulunan mast hücrelerinin enfeksiyonla karşılaştıktan sonra akut dönemde yangısal hücre infiltrasyonlarının artışıyla ilişkili olduğu ve mast hücrelerinden salınan mast hücresi hücre dışı tuzaklarının direk etken yıkımıyla ilişkili olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada ise Listeriozis ile enfekte koyun beyinlerinde şekillenen histopatolojik lezyonlar ile mast hücreleri arasındaki ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada 17 adet enfekte koyun ve 8 adet normal koyun beyninden alınan pons-medulla oblongata bölgeleri incelenmiştir. Histopatolojik olarak mikroapse ve perivasküler infiltrasyonlar, immunohistokimyasal olarak ise *Listeria monocytogenes* pozitiflikleri ile mast hücrelerine yönelik triptaz boyamaları yapılmıştır. Çalışma sonucunda enfekte koyun beyinlerinde mast hücrelerinde belirgin bir artış gözlenmiştir. Mast hücre artışının beyin lezyonlarıyla da doğrudan ilişkili olduğu görülmüştür. Özellikle de mast hücreleri ve mikroapse gelişimi arasında yüksek bir korelasyon tespit edilmiştir. Yine bakteri yoğunluğunun beyin lezyonları ile arasında da yüksek bir korelasyon bulunduğu fakat, mast hücreleri ile arasında anlamlı bir korelasyonun olmadığı görülmüştür. Bu bulgular ile mast hücrelerinin koyunlarda Listeriozis enfeksiyonunda beyin lezyonlarının şiddetiyle orantılı olarak arttığı ve özellikle de akut yangısal reaksiyonların gelişiminde rol oynayabileceği ve ayrıca artan mast hücre sayısının etken mücadelesiyle ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ensefalitis, *Listeria monocytogenes*, mast hücreleri

ABSTRACT

Investigation of Mast Cells in Naturally Infected Sheep Brains with Listeriosis

Listeria monocytogenes is a serious and life-threatening zoonotic disease that causes Listeriosis. Listeriosis is seen with abortion and meningoencephalitis in ruminants, and septicemia in newborns. It has been reported that mast cells in the brain are associated with an increase in inflammatory cell infiltrates in the acute period after exposure to infection and that mast cell extracellular traps released from mast cells are directly related to the destruction of the agents. In this study, it was aimed to investigate the relationship between histopathological lesions and mast cells in sheep brains infected with Listeriosis. Pons-medulla oblongata regions taken from 17 infected sheep and 8 normal sheep brains were examined in the study. Histopathologically microabscess and perivascular infiltrations, and immunohistochemically, *Listeria monocytogenes* positivity and tryptase staining of mast cells were evaluated. As a result of the study, a significant increase in mast cells was observed in infected sheep brains. It has been observed that the increase of mast cells is directly related to brain lesions. Especially a high correlation has been found between mast cells and microabscess development. It was also observed that there was a high correlation between bacteria density and brain lesions, but not a significant correlation with mast cells. With these findings, it was concluded that mast cells increase in Listeriosis infection in sheep in proportion to the severity of brain lesions and may play a role in the development of acute inflammatory reactions, and also that the increased mast cell number may be related to the struggle with agents.

Keywords: Encephalitis, *Listeria monocytogenes*, mast cells

1. GİRİŞ

Listeria monocytogenes, Listeriozis'e sebep olan ciddi ve hayatı tehdit edici zoonotik bir hastalıktır (CFSSAN, 2001). *Listeria* türleri gram (+), mezofilik, sporsuz ve kapsül oluşturmeyen bir bakteridir (Carter, 1984). Listeriozis koyun, keçi ve sığırlarda en sık karşılaşılan hayvan hastalıkları arasındadır. Ruminantlarda Listeriozis'in klinik tablosu genellikle şiddetlidir; abort, yeni doğanlarda septisemi ve meningoensefalitis ile seyrederek (Campero ve ark., 2002). Küçük ruminantlarda görülen ensefalitis, büyük ruminantlarda görülenden daha yüksek ölüm oranına sahiptir. Keçilere göre ise koyunlarda daha sık görülür. Listerial ensefalitis mikro apseler, fokal gliosis ve perivasküler hücre infiltrasyonu ile karakterizedir. Şiddetli lezyonlar beyin stemi (medulla oblongata ve pons) ile sınırlıdır. Listeriozis'in küçük ruminant ve sığırlarda en ciddi etkisi beyin üzerine olanlardır. Ensefalitik Listeriozis'in ilk belirtisi hayvanda meydana gelen değişiklikler ile ortaya çıkar. Bunlar; depresyon, aşırı duyarlılık veya diğer stres faktörleridir. Etkilenen bölgeye bağlı olarak semptomlar meydana gelir. Yüzde ağrıya karşı duyarlılığın azalması, felç ve ataksi görülebilir (Wagner ve ark., 2005). Özellikle koyunlarda görülen Listeriozis'te başını eğme ve başın kalıcı dairesel hareketleri görülür (Radostits ve ark., 2007). Buzdolabı sıcaklığında (+4 °C) varlığını koruyabilen, soğutma, dondurma, ısıtma ve kurutma işlemleri gibi olumsuz şartlar altında dahi canlılığını koruyabilen, halk sağlığı açısından ciddi ve önemli bir hastalıktır (CFSSAN, 2001).

Hastalık çoğunlukla subklinik seyrederek. Hayvanların bağırsaklarında bulunan *Listeria monocytogenes* sadece hayvanların küçük bir kısmında klinik belirtiler ile ortaya çıkar. Hastalık için risk faktörü olacak bir dizi faktör gözlenmiştir. Bunlar arasında konaktaki hayvanın direncinin düşmesine neden olan faktörler ve organizmanın üreme hızını artıran faktörler yer almaktadır. Çiftliklerde genellikle üreme hızını artıran faktörler sebebiyle Listeriozis salgınları risk teşkil eder (Radostits ve ark., 2007). Enfeksiyonlu hayvansal ürünlerin tüketilmesiyle insanlar ve hayvanlar Listeriozis'e maruz kalırlar. Gıda işleme sırasında da meydana gelebilen kontaminasyonlar halk sağlığı açısından önem taşımaktadır. Enfeksiyon buzağılama

sırasında enfekte hayvanlarla doğrudan temas sonucu meydana gelebilir. Ancak bu nadir görülen bir durumdur (Kahn ve Line, 2005).

Listeria, 6 türden oluşur; *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria grayi*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*. Bunların 3 tanesi patojeniktir. *Listeria monocytogenes* 3 patojenden en önemlisidir. Dünya çapında birçok hayvan türünü ve insanı etkilemiştir. Diğer iki patojen tür olan *Listeria ivanovii* ve *Listeria innocua* hayvan sağlığında daha az sıklıkla görülür (Songer ve Post, 2005). *Listeria ivanovii* koyun ve sığırlarda aborta neden olur ve aynı zamanda ruminantlarda ensefalitis ile ilişkili olup klinik ve patolojik olarak *Listeria monocytogenes* ile benzerlik gösterir (Radostits ve ark., 2007).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Listeria'nın Morfolojisi ve Büyüme Özellikleri

Listeri türleri gram (+), mezofilik, sporsuz ve kapsül oluşturmeyen bir bakteridir. Mikroskopta kısa 0,4 ile 0,5 µ eninde, 0,5-2 µ boyunda yuvarlak uçlu çubuklar veya cocobacil şeklinde görülürler. Az O₂ ve yüksek CO₂ konsantrasyonlarında üreyen fakültatif anaeroblardır. Organizmalar 4-45 °C gibi geniş bir aralıkta üreyebilir fakat optimum gelişme sıcaklıkları 30-37 °C'dir (Carter, 1984). Listeria %0,04 Potasyum tellürit, %0,025 Talyum asetat, %3,75 Potasyum tiyosat, %10 NaCl ve %40 safra konsantrasyonlarını tolere ederek canlılığını sürdürebilir. Suşların çoğu 5.5–9.6 pH arasında ürerler. Sporsuz bakterilere göre daha fazla ısı toleransına sahiptir ancak kısa süreli yüksek sıcaklığa (pastörizasyon) dayanamaz ve ölürler (Hirsh ve Zee, 1999).

Bakterilerin bir grup gen özelliği hücre içi ortamda yayılma, çoğalma ve hareketlilik sağlayarak hayatta kalma şanslarını artırır. Organizmalar donma ve erimeye karşı direnir. Dışkı, saman, silaj ve toprakta bir kaç yıl canlılığını sürdürebilir (Radostits ve ark., 2007).

2.2. Epidemiyoloji

Organizma çevrede her yerde bulunabilir. Genellikle hayvan dışkısı, insan dışkısı, çiftlik atıkları, kanalizasyon, toprak, çiftliklerin su kanalları, yüzey suları, bitkiler örnek olarak gösterilebilir (Hirsh ve Zee, 1999; Radostits ve ark., 2007). Kuru maddelerde üreme şansları azdır ancak yem taneleri, samanlar ve bazı yem karışımlarında *Listeria monocytogenes* görülebilir. Dışkı ve salgılardaki organizma varlığına göre aynı yemden beslenen hayvanları etkileyebilir (Radostits ve ark., 2007). *Listeria monocytogenes* genellikle silajlarda mevcuttur. Düşük kaliteli ve pH 5.5'ten büyük silajlar Listeriosis ile ilişkilendirilir ve 'Silaj Hastalığı' olarak nitelendirilir (Hirsh ve Zee, 1999). Ancak aerobik, yüksek yoğunluklu, yüksek konsantrasyonlu ve pH 4.5 altında olan kaliteli silajlarda varlığını gösteremez. Kötü fermante edilmiş silajlarda bulunur. Silajın toprak ile karışması halinde Listeria kontaminasyonu

fazladır. Nemli silajlar *Listeria* açısından risk teşkil eder. Islak saman balyaları, enginar ve benzeri meyve-sebze atıkları gibi yan ürünlerden yapılan silajlarla beslenen hayvanlar hastalığa bir adım daha yakındır. Enfekte hayvan idrarları, dışkı, yavru atıkları, uterus suları ve süt enfeksiyon kaynağı olarak gösterilebilirler (Radostits ve ark., 2007).

Sağlık koşullarının yetersiz olması, yetersiz beslenme, ani hava değişimleri, çok soğuk ve nemli havalar, gebelik süresinin uzaması ve doğum stresleri, kötü taşıma şartları, beslenme kaynaklarına ve meraya erişimin zor olması gibi faktörlerin görülmesi hastalık açısından önemli risk teşkil eder (Hirsh ve ark., 2004). Rasyonlarda veya çiftlik ortamında *Listeria monocytogenes* çoğalması enfeksiyon riskini büyük ölçüde artırır. Mısır silajı, Listeriozis oluşumu için önemli bir risk faktörü olarak gösterilir. Son yıllarda ruminantlarda yapılan araştırmalar sonucu rasyonda silajın fazla kullanılmasıyla hastalığın yaygınlaşmasında belirgin artış görülmüştür. Kanalizasyon alanlarında yaşayan ve çiftliklere gelen yabancı kuşlar taşıyıcı olarak görev alırlar. Silaj, yem ve merayı kontamine ederek sürüye öldürücü suşların getirilmesinde rol oynarlar. Organizma koyun dışkısında 3 ay kadar, nemli topraklarda 11,5 ay, sığır dışkısında 16,5 aya kadar, kuru samanda 207 güne kadar ve kuru toprak-dışkıda 2 yıldan fazla varlığını sürdürebilir (Campero ve ark., 2002).

Listeriozis ilkbahar ve kış mevsimlerinde yaygın olarak görülür ve bu da ruminant çiftliklerinde *L. monocytogenes* yayılmalarının mevsimlere bağlı olduğunu gösterir. Ayrıca kuzulama dönemi, gebelik dönemi ve çevresel strese bağlı olarak hastalığın görülme sıklığı artabilir. Keçilerde Listeriozis, dışkı ile kontamine olmuş su veya yemin ağız yoluyla alınmasıyla ya da *Listeria monocytogenes*'in dışkı yoluyla atılmasıyla aktarılır. Solunum yolu ile enfeksiyona neden olan etkenler vücuda girebilir. Enfekte hayvanlar tedavi edilmezse ölebilir (Wood, 1992).

Listeria'nın oluşum epidemiyolojisinde coğrafi konumun etkisi olduğu düşünülmektedir. Organizma doğada yaygın halde bulunur fakat klinik hastalık tabloları çoğunlukla kuzey ve güney enlemlerinde görülür. Kuzey Amerika, Avrupa, İngiltere, Yeni Zelanda ve Avustralya'da önemli bir hastalık olarak nitelendirilir. Tropikal iklimlerde subtropikal ılıman iklimlere göre çok daha az görülür. Kuzey yarım

kürede Listeriozis, muhtemelen silajların yapıldığı mevsim ile ilişkilidir (Radostits ve ark., 2007). En fazla Mayıs ve Aralık ayları arasında yayılım gösterir (Hirsh ve ark., 2004).

2.3. Listeria'nın Patogenezi

Listeriozis'te zedelenmenin mekanizması akut yangı ve mediatörleri ile yıkımlayıcı enzimler tarafından oluşturulan hücre lizisidir. Makroskopik lezyonlar sıklıkla gözlenmez fakat bulunduğu zaman aktif hiperemi ve/veya hemoraji ile birlikte nodüller ve çizgisel bant şeklinde gri-sarı eksudat varlığı, spesifik olarak beyin köküne lokalize olan ve perivasküler bir patern gösteren şekildedir (Zachary, 2017).

L. monocytogenes'in hem in-vivo hem de in-vitro olarak benzersiz bir nöroinvaziv özellik göstermesi en az üç farklı mekanizma ile gerçekleşir (Drevets ve ark., 2004). Bunlar (1) enfekte lökositler içerisinde kan koroid bariyerini veya kan beyin bariyerini geçmesi, (2) ekstraselüler olarak kandan gelip endotel hücrelerine direk invazyonu ve (3) kranial sinirlerin aksonları içerisinde beyne doğru retrograd (sentripedal) göç etmesidir (Drevets ve Bronze, 2008).

Sığır, koyun ve keçiler *Listeria monocytogenes* ile topraktan, yemlerden, sudan ve dışkıdan enfekte olabilirler fakat en büyük risk uygunsuz şekilde depolanan silajlarda pH'nın yükselmesi sonucunda bakterinin aşırı çoğalmasının engellenemediği durumlardır. *L. monocytogenes* ile kontamine silaj merkezi sinir sistemi hastalığı için tek başına yeterli değildir, aynı zamanda ağız boşluğundaki penetre yaralar sonrasında bakterinin silajdan ağız boşluğu veya dilin submukozal bağ dokusuna taşınması mümkün olur. Bu noktada bakteri oral dokularda çoğalır, ağız boşluğundaki sinir sonlarına giriş yapar ve kranial sinirlerde retrograd aksonal taşınma yoluyla merkezi sinir sistemine doğru asendens enfeksiyon şekillendirir. Ağız boşluğu primer olarak beyin kökünde sonlanan trigeminal ve diğer kranial sinirler ile innerve edilir. Bu nedenle *L. monocytogenes* eninde sonunda beyin kökünde (örn pons, medulla oblongata ve proksimal servikal spinal kanal) lokalize olur. Sinir sonlarına etkenin giriş mekanizması bilinmemektedir, ancak deneysel hücre kültürü çalışmalarında *L. monocytogenes*'in endositozis ve endositik veziküller aracılığıyla tipik olarak nonfagositik hücrelere girişi gösterilmiştir. Bakteriyel internalizasyon giriş sürecidir

ve hedef hücrenin bir transmembran glikoproteini olan E-kaderin reseptörlerini kullanan internalinler (tip A ve B) tarafından gerçekleştirilir (Zachary, 2017). Bakteri yüzey invazyon proteinlerini (internalin A ve internalin B) kullanarak endotel hücreleri, enterositler ve fibroblastlar gibi nonfagositik hücelere invaze olabilir (Ireton, 2007). İnternalin A için hücresel ligand E-kaderin'dir ki bu protein epitel hücreleri arasındaki bağlantılarda mevcuttur (Jacquet *ve ark.*, 2004; Wollert *ve ark.*, 2007). İnternalin B ise daha çok hücreye girişte önemlidir ve daha yaygın olan hücresel reseptör Met'ler kullanılır. Hem internalin A hem de B protein hücrelerde intraselüler sinyalleri başlatır ve hücre iskeletinde yeniden düzenlenmeye ve bakteri internalizasyonuna neden olur (Hamon *ve ark.*, 2006).

L. monocytogenes beyin köküne ulaştığında, nöron hücre gövdeleri içerisindeki hücre içi endozomlarda kalır. Başlangıçta kan-beyin bariyerini bozmaz ve böylece doğal ya da edinsel immun yanıt tarafından oluşturulan savunma mekanizmalarını aktive etmez. Enfekte nöron hücre gövdelerinin sitoplazması bakterinin serbest şekilde proliferasyonuna olanak tanır. Bu rahat çevrenin bir bakteriyel virülens faktörü olan Listeriolizin O (LLO) tarafından desteklendiği görülmektedir ki bu faktör immun yanıtı baskılayarak, enfekte hücrelerin savunma sisteminden gizlenmesine olanak sağlar (Zachary, 2017). *L. monocytogenes* beyne ulaştığında makrofajlar ve nötrofiller tarafından komplement bağımlı ve komplement bağımsız mekanizma ile fagosite edilir (Drevets *ve ark.*, 1992). Konak hücreye giriş yaptıktan sonra *L. monocytogenes* hızlı şekilde por oluşturan hemolizin, LLO ve iki fosfolipaz (A ve B) etkisiyle fagozomlardan kaçır ve daha sonra sitozolde replike olur (O'Riordan, 2002; Schnupf ve Portnoy, 2007). Sitozolik bakteriler ActA protein ve F aktin filamentlerini kullanarak moleküler bir motor oluşturur ve böylece hücreler arası hareket kabiliyeti kazanır (Tilney ve Portnoy, 1989; Kocks *ve ark.*, 1992).

Hücre sitoplazmasında bakteri sayısı yaklaşık olarak 1 saat içerisinde iki katına çıkar. Sitoplazmada bakteri sayısı, bitişik hücrelerin enfeksiyonunu kolaylaştırmak için yeterli bir seviyeye ulaştığında, bakteri kendilerini, sitoplazmada virülans faktörü ile kolaylaştırılan, hedef hücre aktin filamentlerinin polimerizasyonu ve depolimerizasyonu yoluyla hücre zarının iç tarafına hareket ettirir (Tilney ve Portnoy, 1989; Kocks *ve ark.*, 1992; Zachary, 2017). Bir kez hücre zarına ulaştığında, bakteri

agregatları kendilerini aktin polimerizasyonu (listerial aktin esaslı hareketlilik) ve bir yalancı ayak yoluyla komşu hücrenin içerisine sevk etmek amacıyla çift membran endositotik fagositik veziküllerin oluşumuyla sonuçlanan invaginasyonlar oluşturmak için yüzey proteini actA adı verilen bir bakteriyel yüzey proteini kullanırlar (Tilney ve Portnoy, 1989; Kocks *ve ark.*, 1992; Zachary, 2017). Bu süreç rastgeledir, bu nedenle sinir sistemindeki hedef hücreler için spesifik olarak görülmemekte, yalnızca komşu hücreleri etkilemektedir. Bu çift membran endositotik fagositik veziküller LLO, Fosfolipaz C ve Lesitinaz tarafından lize edilir ve bakteri yeni enfekte olmuş hücrelerin sitoplazmasına salınır (Zachary, 2017).

L. monocytogenes çok çeşitli memeli hücrelerine invaze olarak replike olabilir (Drevets ve Bronze, 2008). Deneysel olarak, *L. monocytogenes*'in nötrofilleri, makrofajları, fibroblastları, endotel hücrelerini ve nöronları ve mikrogial hücreleri içeren çeşitli sinir hücre tiplerini enfekte ettiği gösterilmiştir. Kapillar endotel hücrelerin zedelenmesi ve enfeksiyonunun yangısal süreci başlattığı görülmektedir. Bir kez başladığında, kan-beyin bariyeri bozulur ve tam bir yangı silsilesinin aktivasyonu şekillenir. Nötrofiller hayvanların savunma mekanizmasında bakterileri öldürmek için primer efektör hücrelerdir. Deneysel olarak, *L. monocytogenes* ile enfekte endotel hücreleri bol miktarda endotelyal adezyon molekülleri (P ve E selektin) hücreler arası adezyon molekülü ve vasküler hücre adezyon molekülü eksprese eder ve nötrofil adezyon basamağı ve nötrofil bağlanmasıyla sonuçlanır ki bu iki basamak da akut yangısal yanıtın bileşenleridir. Bakteri aynı zamanda makrofajlardan endotel hücrelerine de yayılabilir (Zachary, 2017).

2.4. Klinik Bulgular

Listeriozis'in klinik bulguları alınan organizma sayısına, suşların patojenik özelliklerine ve konağın immun durumuna bağlıdır. Listeriozis'in 3 ana klinik formu vardır. Bunlar septisemik form, ensefalitik form ve abort formudur (Carter, 1984).

2.4.1. Septisemik Form

Septisemik form depresyon, iştahsızlık, ateş ve ölümle kendini gösterir. Koyun ve keçilerdeki septisemik hastalık genellikle kontamine silajların alımından 2 gün

sonra ve abortlardan 6-13 gün sonra ortaya çıkar (Radostits ve ark., 2007). *L. monocytogenes* kaynaklı akut septisemiler yetişkin ruminantlarda yaygın değildir ancak monogastrik hayvanlarda ve yeni doğan kuzu, buzağılarda görülür. Merkezi sinir sistemi ile ilgili herhangi bir bulgu yoktur. Kilo kaybı, ishal ve dehidrasyon görülebilir. Milier viseral apselerle karakterizedir. Viseral enfeksiyon genellikle intrauterin enfeksiyonun bir devamıdır. Nekropside karaciğerde çoklu nekroz odakları görülürken bu lezyonlar dalak, kalp, akciğerler, sindirim sistemi ve beyinde daha az görülür. Mikroskobik olarak bu bölgelerde fokal nekroz, mononükleer hücre ve nötrofil infiltrasyonları vardır. Ayrıca gastroenteritis tablosu görülür (Scanlan, 1988).

2.4.2. Ensefalitik Form

Ruminantlarda en sık görülen formdur sporadik seyirlidir ve 'dönme hastalığı' olarak bilinir. Çoğunlukla erişkin ruminantlarda görülür fakat bir haftadan büyük kuzu ve buzağılarda da görüldüğü bildirilmiştir. Bu form genellikle kışın ve ilkbahar başlangıcında görülür. Hastalık koyun ve keçilerde daha çok akut ve ölümcül seyrederken sığırlarda kronik seyirlidir (Hirsh ve Zee, 1999). Koyunlarda kontamine silaj oral yolla alındıktan 3-4 hafta sonra ensefalitis formu görülmeye başlar. Enfeksiyon zamanla şiddetlenir (Johnson ve ark., 1995). Etkenler medulla oblongataya ulaşır ve beyin steminde şiddetli lezyonlar gelişir. Koyunlar arasında farklı tablolar meydana gelir. Koordinasyon bozukluğu, başını bir yere sıkıştırma ve aşağıda tutma, daire hareketleri, tek taraflı yüz felci ve göz kapağının düşmesi, tek taraflı veya yüzün tamamının felç olması durumları görülebilir. Başın geriye doğru eğilmesi veya karna doğru eğilmesi lezyonun lokasyonuna bağlı olarak ortaya çıkar. Başın eğilmesi hayvan tarafından düzeltilemez. El yardımıyla düzeltilse bile serbest bırakınca önceki konumuna geri döner. Ataksi yüzünden sık sık baş bir tarafa düşer ve etkilenen hayvanlarda baş bir yere dayalı halde görülür. Bu hayvanlar bacaklarını hareket ettirebilirler fakat iki ayakları üstünde duramazlar ya da zıplayamazlar. Kulağın sarkması, dudak felci, göz kapağının düşmesi ve hiperaljezi yüz paralizinde görülen bulgulardır. Şiddetli keratite maruz kalma kornea ülserasyonuna neden olabilir. Çene kaslarının zayıflamasıyla güç kayıpları meydana gelir ve böylece çiğneme yavaşlar, yemi kavrama yeteneği azalır. Uzun periyotlarla salya akışı görülür ve yem taneleri ağızdan düşer. Dehidrasyon ve açlık ölüme ortam hazırlar bunun sonucunda solunum

yetmezliği ile ölüm şekillenir. Keçilerde hastalık koyunlardakine benzer ancak genç keçilerde çok ani görülür ve 2-3 gün içinde ölümlerle sonuçlanır (Scanlan, 1988; Songer ve Post, 2005).

2.4.3. Abortif Form

Ruminantlarda yaygındır ve koyunlarda genellikle gebeliğin 12. haftasından sonra görülmeye başlar ve görülme oranı en fazla %15'tir. Etken fötüsün karaciğerinde çoğularak yumuşamasına ve zamanla ölümüne ve atılmasına sebep olur. Metritis görülebilir. Abort formları genelde koyun ve keçilerde görülür ve bir kaç gün boyunca kanlı vajinal akıntı meydana gelir. Bazı çiftliklerde abort formu her yıl tekrar edebilir (Scanlan, 1988).

2.5. Nekropsi Bulguları

Tipik olarak listerial ensefalit ile ilişkili belirgin değişiklikler vardır. Santral Sinir Sistemi'nde genel bir hiperemi ve ödem görülür. Spesifik lezyonlar özellikle pons ve medulla oblongatada, daha az olarak da thalamus ve medulla spinalisin servikal kısmında oluşur. Bu bölgelerde meninklerde jelatinöz bir ödem ve kesit yüzlerinde hiperemi ile boz renkli erime odakları görülebilir. Tipik makroskobik olgular genellikle erişkin hayvanlarda ilerlemiş olgularda gözlenebilir. Lezyonlar beyin parankiminde başlar, meningitisi sekonder olarak gelişir (Radostits *ve ark.*, 2007). Beyin Omuruluk Sıvısı (BOS) bulanıklaşır ve meningeal damarlar tıkanır (Hirsh ve Zee, 1999). Tipik parankimal lezyonlar nötrofil lökositlerinde bulunduğu mikro apseler halinde oluşan yoğun hücre infiltrasyonları şeklindedir. Mikro apsenin yanı sıra mikroglial reaksiyon da gelişir. Bu bölgedeki parankim ödemlidir (Radostits *ve ark.*, 2007). Bazen medullada yumuşama alanları görülür (Hirsh *ve ark.*, 2004). Nekropside ayrıca sindirim, solunum ve dolaşım sisteminin yetersizliğini gösteren bulgular görülebilir. Sindirimin yavaşlamasına bağlı olarak ön midelerde içeriğin fazla olması, omasum içeriğinin sertleşmesi ve solunum sisteminde ise tracheada genişleme, kaudal loblarda atelektazi gibi bulgular örnek olarak gösterilebilir. Abort fötüsler genellikle ödemli ve otolizlidir. Koyunlarda plasentitis ve endometritis görülebilir.

Enteritli koyunlarda ülseratif abomasit görülür ve bazılarında tiflokolitis görülebilir (Radostits *ve ark.*, 2007).

2.6. Mikroskopik Bulgular

Tüm organlarda mikroskopik lezyonlar belirgin vaskülitis ve vasküler nekroz ile karakterize olup, bunu tromboz ve infarktüs takip eder. Vaskülitis etkilenen damar çevrelerinde bölgesel ödem ile nötrofil ve makrofaj infiltrasyonu ile ilişkilidir. Etkilenen damar bölgelerinde, trombüste ve infarkte dokuda küçük bakteri kolonileri gözlenebilir (Zachary, 2017). Tespit edilmiş beyin dokusunun histopatolojik incelemesi genellikle nöral Listeriozis tanısını ortaya koyabilir. Beyin stemindeki tek taraflı mikro apseler genellikle perivasküler infiltrasyon ile birlikte Listeriozisin karakteristik özelliklerini yansıtır (Quinn *ve ark.*, 2002; Hirsh *ve ark.*, 2004).

2.7. Mast Hücreleri ve Listeriozis'te Rollerini

Mast hücreleri, çeşitli patojenlere karşı doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin önemli hücreleridir. Bunlar, mikropların konakçıya, deri ve mukozal yüzeylere eriştiği dokulardaki stratejik konumları nedeniyle istilacı patojenleri tespit eden ilk bağışıklık hücrelerinden biridir (St. John ve Abraham, 2013). Ayrıca mast hücreleri, antikora ihtiyaç duymadan patojenlerin doğrudan tanınmasına olanak tanıyan geniş bir Kalıp Tanıma Reseptörleri (PRR) eksprese ederler (Campillo-Navarro *ve ark.*, 2014). İlk çalışmalar mast hücrelerini parazitik enfeksiyonlara karşı koruma ile ilişkilendirmiş olsa da (Woodbury *ve ark.*, 1984), daha sonraki çalışmalar bu hücrelerin bakteriler (Malaviya *ve ark.*, 1996), virüsler (St. John *ve ark.*, 2011) protozoa (Maurer *ve ark.*, 2006) ve mantarlar (Nieto-Patlán *ve ark.*, 2015) gibi farklı patojenlere karşı da önemli olduklarını göstermiştir. Genellikle patojenin neden olduğu mast hücresi aktivasyonu, bunların bozulmasına ve sitokinler ve kemokinler gibi birkaç proenflamatuar mediyatörlerin üretilmesine yol açar. Mast hücreleri tarafından teşvik edilen bu enflamatuar ortam, patojenlerin kontrolünden sorumlu özel efektör hücrelerinin enfeksiyon bölgesine alınmasına izin verir (St. John ve Abraham, 2013). *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* (Malaviya *ve ark.*, 1996), *Citrobacter rodentium* (Wei *ve ark.*, 2005), *Pseudomonas aeruginosa* (Siebenhaar *ve ark.*, 2007)

ve *Listeria monocytogenes* (Gekara ve Weiss, 2008) dahil olmak üzere çeşitli patojenik bakterilerle enfeksiyon sırasında mast hücrelerinin önemi gösterilmiştir.

Mast hücreleri, aktiviteleri, enflamatuar yanıtların hızlı bir şekilde başlatılmasından immüno-supresyona kadar değişen çok çeşitli bağışıklık yanıt hücreleridir (Chacón-Salinas ve ark., 2011; St. John ve Abraham, 2013; Chacon-Salinas ve ark., 2014). Doğal bağışıklık, nötrofillerin ve makrofajların tanınması ve aktivasyonu yoluyla *L. monocytogenes* enfeksiyonunun tutulmasında önemli bir rol oynar. Bununla birlikte, daha önceki çalışmalar, mast hücrelerinin, bakteriyel enfeksiyonun kontrolüne katkıda bulunan fagositik hücrelerin toplanmasına izin veren bir yangısal yanıtın indüklenmesi yoluyla *L. monocytogenes* enfeksiyonunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Gekara ve Weiss, 2008; Jobbings ve ark., 2013). Campillo ve arkadaşları (2017) mast hücresi hücre dışı tuzaklarının (MCET) *L. monocytogenes*'lerin büyümesini inhibe etme yeteneğine sahip olduğunu gözlemlemiştir. *L. monocytogenes* enfeksiyonu sırasında reaktif oksijen türleri bağımlı MCET üretimi şekillendiğini ve ayrıca, MCET'lerin antibakteriyel etkileri gösterilmiştir (Campillo-Navarro ve ark., 2017).

Mast hücreleri ayrıca doğrudan patojenleri öldürebilir. Mast hücrelerinde tanımlanan ilk antimikrobiyal mekanizmalardan biri gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerin fagositozudur (Malaviya ve ark., 1996; Arock ve ark., 1998). Mast hücreleri tarafından bakterileri öldürmek için kullanılan ve daha yakın zamanda tarif edilen bir mekanizma, birkaç proteinin (histonlar ve granüler proteinler) gömülü olduğu nükleer DNA tarafından oluşturulan MCET'lerin serbest bırakılmasıdır (Von Köckritz-Blickwede ve ark., 2008). MCET üretimi, Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat Hidrojen (NADPH) oksidaz tarafından üretilen reaktif oksijen türlerine bağlıdır ve genellikle nükleer zarfın bozulması ile karakterize edilen bir hücre ölüm mekanizmasına yol açar (Von Köckritz-Blickwede ve ark., 2008). Campillo ve arkadaşları (2017) MCET'lerin *L. monocytogenes*'lerin büyümesini inhibe etme yeteneğine sahip olduğunu gözlemlemiştir. *L. monocytogenes* enfeksiyonu sırasında reaktif oksijen türleri bağımlı MCET üretimi şekillendiğini ve ayrıca, MCET'lerin antibakteriyel etkileri gösterilmiştir (Campillo-Navarro ve ark., 2017). MCET'ler, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus*

pyogenes, *Enterococcus faecalis* ve mantar *Candida albicans* (Von Köckritz-Blickwede *ve ark.*, 2008; Abel *ve ark.*, 2011; Scheb-Wetzel *ve ark.*, 2014; Lopes *ve ark.*, 2015) gibi hücre dışı bakteriler ile *in vitro* enfeksiyon sırasında gözlenmiştir. Bununla birlikte, DNA hücre dışı tuzakların oluşumu ilk olarak nötrofillerde ve daha sonra diğer miyeloid hücrelerde tanımlanmıştır (Brinkmann *ve ark.*, 2004; Yousefi *ve ark.*, 2008; Morshed *ve ark.*, 2014). Dikkat çekici bir şekilde, *L. monocytogenes* gibi hücre içi bakteriler de dâhil olmak üzere birçok bakteri, nötrofil hücre dışı tuzaklarını indükleyebilir (Ramos-Kichik *ve ark.*, 2009). Campillo *ve arkadaşları* (2017) yaptıkları çalışmada *L. monocytogenes*'e zayıf fagositik olan mast hücrelerinin, bu bakterilerle aktivasyondan sonra MCET ürettiğini ve bakteri büyümesini inhibe etme yeteneğine sahip olduklarını göstermişlerdir (Campillo-Navarro *ve ark.*, 2017).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda koyunlarda Listeriozis'te mast hücrelerinin önemli rollerinin olabileceği düşünülmüştür. Çalışma ile Listeriozis ile doğal enfekte koyun beyinlerinde histopatolojik beyin lezyonları ile mast hücrelerinin yoğunluğu arasındaki ilişkinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada geçmiş yıllarda anabilim dalımıza gelen 17 adet listeriozisli koyun beyinlerinin arşivdeki blokları kullanıldı. Çalışmada kullanılan hayvanlara ait bilgiler Tablo 3.1.'de verilmiştir. Ayrıca 8 adet normal koyun beyin dokuları da kontrol grubu olarak değerlendirildi. Bu bloklardan histopatolojik, histokimyasal ve immunohistokimyasal analizler için normal ve lizinli lamlara kesitler alındı. Histopatolojik analizler için rutin hematoksil-eozin boyaması yapıldı.

Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılan Kontrol Grubu ve Listeria Grubu Vakalara Ait Bilgiler

Vaka No	Grup	Tür	İrk	Cinsiyet	Yaş
1.	Listeria	Koyun	İvesi	Dişi	5 yaş
2.	Listeria	Kuzu	İvesi	Dişi	2 ay
3.	Listeria	Kuzu	İvesi	Dişi	5 ay
4.	Listeria	Koyun	Pırit	-	3 yaş
5.	Listeria	Koyun	İvesi	Dişi	5 yaş
6.	Listeria	Koyun	Pırit	Erkek	1 yaş
7.	Listeria	Koyun	İvesi	Dişi	3 yaş
8.	Listeria	Koyun	-	-	3 yaş
9.	Listeria	Koyun	Pırit	Erkek	4 yaş
10.	Listeria	Koyun	Merinos	Dişi	3 yaş
11.	Listeria	Koyun	Merinos	Dişi	3 yaş
12.	Listeria	Kuzu	-	Erkek	2 ay
13.	Listeria	Koyun	Mandak	Dişi	2 yaş
14.	Listeria	Koyun	-	-	-
15.	Listeria	Koyun	-	Erkek	5 ay
16.	Listeria	Koyun	Merinos	Dişi	4 yaş
17.	Listeria	Koyun	-	Dişi	2 yaş
18.	Kontrol	Koyun	-	Dişi	5 yaş
19.	Kontrol	Kuzu	-	Erkek	1,5 ay
20.	Kontrol	Koyun	-	Dişi	1 yaş
21.	Kontrol	Kuzu	-	-	5 ay
22.	Kontrol	Koyun	-	Dişi	2 yaş
23.	Kontrol	Koyun	-	Dişi	2 yaş
24.	Kontrol	Koyun	-	Dişi	6 ay
25.	Kontrol	Kuzu	-	Dişi	8 ay

Histopatolojik analizler için kesitler deparafinize edildikten sonra dereceli alkollerden geçirilerek distile suya konuldu. Ardından Hematoksil solüsyonunda 8 dakika tutuldu. Akan suda 5 dk yıkandı. 10 sn alkol solüsyonundan geçirildi. Eozin solüsyonunda 1,5 dk tutuldu. Distile suda fazla eozin uzaklaştırıldı. 10'ar sn

alkollerden geçirildi ve kurutmaya bırakıldı. Ardından entellan kullanılarak lamel ile dokular kapatıldı.

Histopatolojik skorlamalar Senay ve arkadaşlarının (Senay ve ark., 2020) çalışmasındaki skora temel alınarak gerçekleştirildi. Buna göre pons/medulla oblongata bölgelerinin histolojik kesitlerinde mikroapse, perivasküler infiltrasyon ve bakteri miktarı 0-4 arasında skorlandı. İncelenen kesitlerin bazılarında kesitlerde meningeal yapıların gözlenememesinden dolayı meningitis açısından değerlendirmeler skorlamaya dâhil edilmedi. Mikroapse skorlamasında derecelendirme, 0; mikroapse yok, 1; tek küçük mikroapse oluşumu, 2; birkaç küçükten büyüğe değişen mikroapse oluşumları, 3; orta sayıda ve birleşme gösterebilen mikro apse oluşumları, 4; çok sayıda ve parenkimin büyük bir bölümünü kaplayan, birleşmiş mikroapse oluşumları şeklinde yapıldı. Ayrıca mikroapse oluşumlarındaki baskın hücrelere göre nötrofil ve mononükleer hücreler şeklinde sınıflandırma yapıldı. Perivasküler infiltrasyonların skorlamasında derecelendirme 0; infiltrasyon yok, 1; çoğunlukla lenfositlerden oluşan tek katman perivasküler hücre infiltrasyonu, 2; iki katman şeklinde hücre infiltrasyonu, 3; üç katman şeklinde hücre infiltrasyonu ve 4; dört katman veya daha fazla hücre infiltrasyonu şeklinde yapıldı. Bakteri miktarlarının değerlendirilmesinde immunohistokimyasal olarak *Listeria* antikoruna ile pozitif boyanan alanlar değerlendirilerek, 0; pozitiflik yok, 1; hafif pozitifliği, 2; orta dereceli pozitiflik, 3; birkaç odakta çok sayıda bakteri pozitifliği ve 4; yoğun bakteri pozitifliği şeklinde skorlandı.

Normal lamlara alınan dokulara aynı zamanda mast hücrelerinin gösterilmesi amacıyla Toluidine blue boyaması yapıldı. Boyama için kesitler deparafinize edildikten sonra dereceli alkollerden geçirilerek suya konuldu. Dehidre edilen dokulara Toluidine blue solüsyonu dökülerek 2-3 dakika beklendi. Daha sonra kesitler distile suda yıkandı ve ardından hızlıca bir kez % 95'lik ve iki kez % 100'lük alkollerden geçirildi. Daha sonra kurutulan lamlar entellan ile kapatıldı.

Beyin dokularında Listeriosis tanısının doğrulanması amacıyla *Listeria monocytogenes* antikoruna (Novus biologicals, NB100-65667) kullanıldı. Mast hücrelerinin ortaya konulması için histokimyasal olarak Toluidine blue, immunohistokimyasal olarak ise anti-tyriptase antikoruna (Biolegend, Mast cell tyriptase

antibody, clone AA1) kullanıldı. Pozitif kontrol olarak köpek mast hücre tümörü kullanıldı. Listeria ve triptaz antikoruyla immunohistokimyasal boyamalar için kesitler deparafinize edildikten sonra dereceli alkollerden geçirilerek suya konuldu. Antijen retrieval işlemi için dokular 120 derecede otoklavda 20 dakika boyunca tutuldu. PBS ve distile suda ile 5'er dk yıkama yapıldı. Hidrojen peroksitte %3'lük 15 dakika bekletildi. PBS ile 5 dk yıkama yapıldı. Normal goat serum blok solüsyonu 30 dk tutuldu. *Listeria monocytogenes* antikoruna 1/500 oranında veya anti-tyriptase antikoruna 1/50 oranında sulandırılarak bir gece boyunca +4 derecede bekletildi. Ertesi gün dokular PBS'te 2x5dk yıkandı. Sekonder antikor olarak Goat anti-polivalent (Mouse-rabbit) 30 dk uygulandı. Pbs ile 5x2 dk yıkama yapıldı. Streptavidin peroksidaz 30 dk uygulandı. PBS ile 5x2 dk yıkama yapıldı. Diaminobenzidin (DAB) solüsyonu 1-2 dakika uygulandı. Karşı boyama için Merck Mayer hematoksilen solüsyonu 20 sn uygulandı. Daha sonra preparatlar kurutuldu ve entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı.

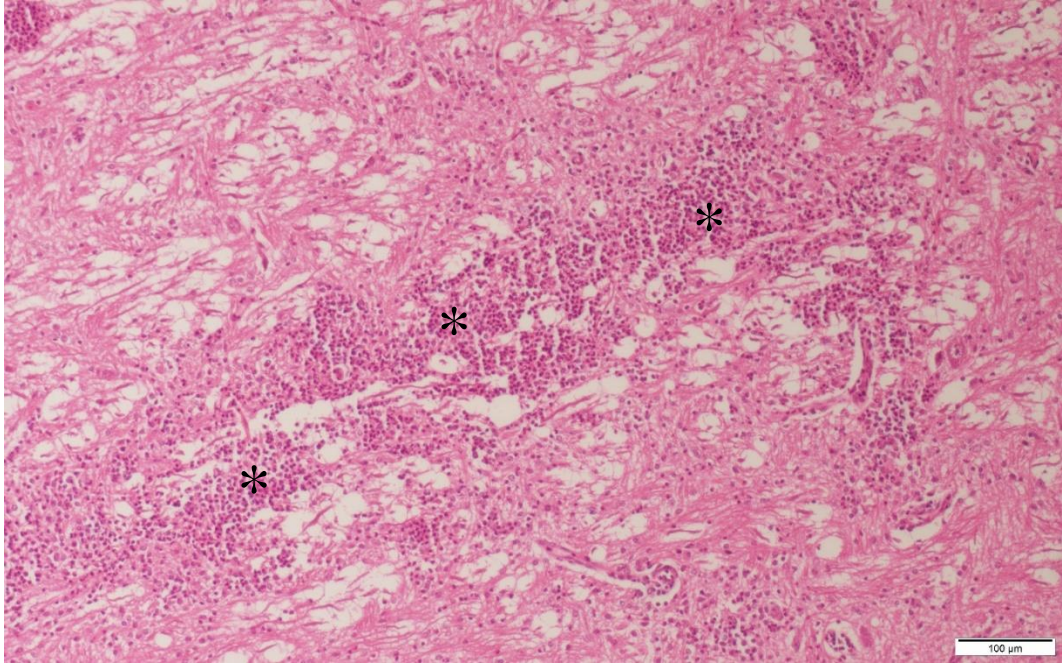
Histokimyasal ve immunohistokimyasal boyanmaların değerlendirilmesi semikantitatif olarak yapıldı. Pozitif olarak boyanan hücrelerin yoğunluğuna göre (0; yok, 1; hafif, 2; orta ve 3; yoğun ve 4; çok yoğun) skorlamalar yapıldı. Mast hücrelerinin değerlendirilmesinde toluidine blue ve triptaz pozitif hücreler 5 farklı yüksek büyütme alanında sayılarak elde edilen rakamlar üzerinden 0-4 arasında toplam mast hücre skoru belirlendi.

Tüm verilerin gruplar arasında karşılaştırılması için Minitab 16 paket programı (versiyon 16.1.1) kullanıldı. Elde edilen lezyon skorlamalarının ve mast hücre skorlarının normal dağılım gösterip göstermediğini belirlemek için Ryan-Joiner normalite testi uygulandı. Normal beyin dokuları ile Listeria'lı beyin dokularının mast hücre yoğunluğu açısından karşılaştırılması ikili T testi ile gerçekleştirildi. Korelasyon için ise Pearson korelasyon testi kullanıldı. Korelasyon analizinde elde edilen total mast hücre skoru ile ortalama beyin lezyon skoru karşılaştırmasının yanısıra, mast hücre skorlarının mikroapse, perivasküler infiltrasyon ve listeria yoğunlukları arasındaki korelasyon da ayrı ayrı değerlendirildi. Böylece mast hücre yoğunluklarının beyin lezyonlarının şiddeti olan ilişkisi değerlendirildi.

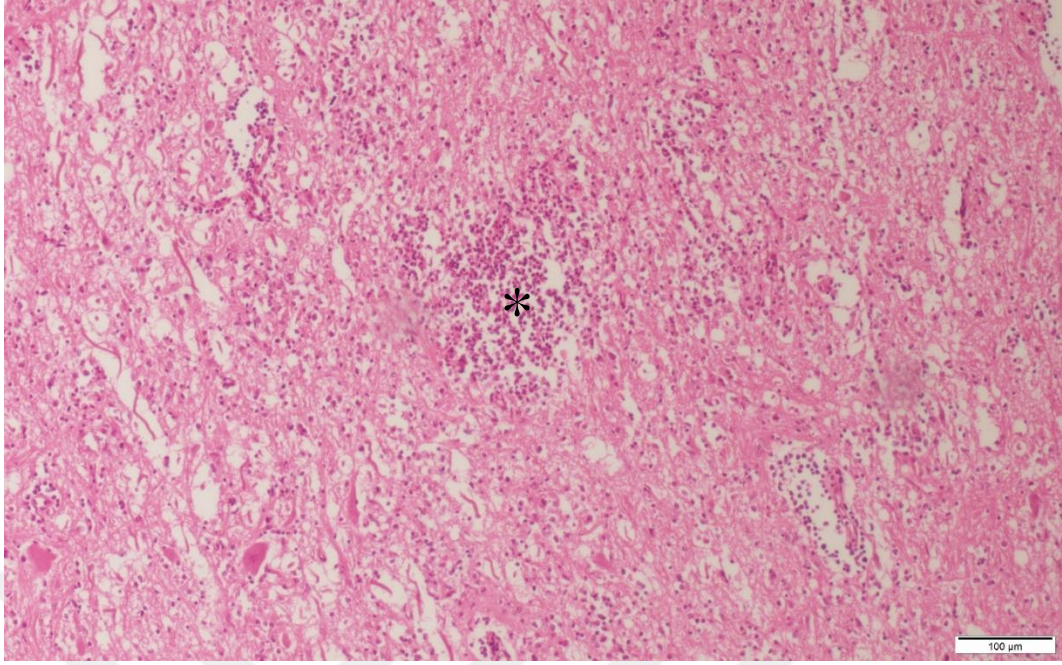
4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik Bulgular

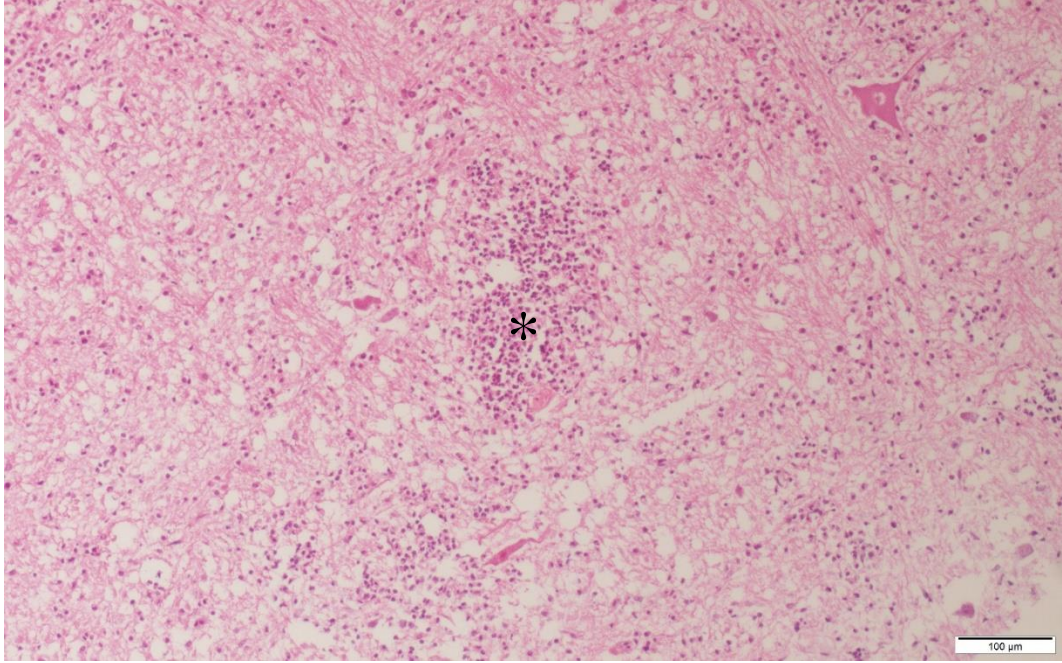
İncelenen kesitlerde mikroapse ve perivasküler hücre infiltrasyonları değerlendirildi. Lezyon skoru 0-4 arasında skorlandı. Mikroapse açısından yapılan incelemelerde beş olguda skor 4 (Şekil 4.1.), yedi olguda skor 3 (Şekil 4.2.), üç olguda skor 2 (Şekil 4.3.) ve iki olguda skor 1 (Şekil 4.4.) olarak belirlendi. Perivasküler infiltrasyon açısından yapılan değerlendirmede altı olguda skor 4 (Şekil 4.5.), altı olguda skor 3 (Şekil 4.6.), dört olguda skor 2 (Şekil 4.7.) ve bir olguda skor 1 (Şekil 4.8) olarak belirlendi. Mikroapse oluşumları ile perivasküler infiltrasyonlar arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilemedi ($P>0,05$).



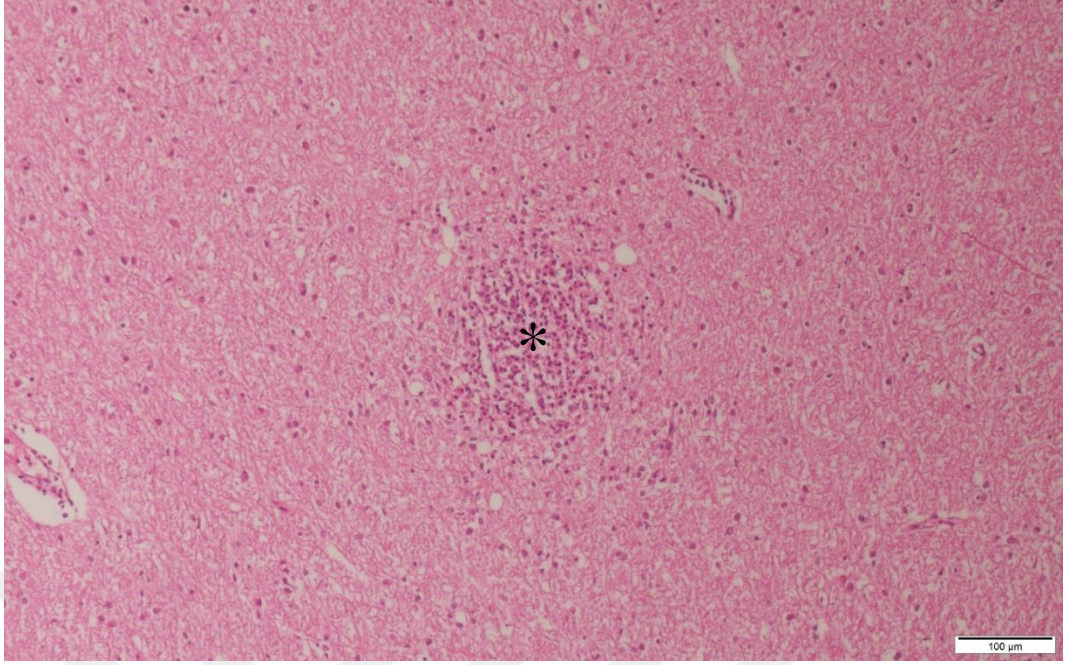
Şekil 4.1. Çok sayıda ve beyin parankiminin büyük bölümünü kapsayan mikroapse oluşumları (asteriskler). H&E. Bar: 100 µm.



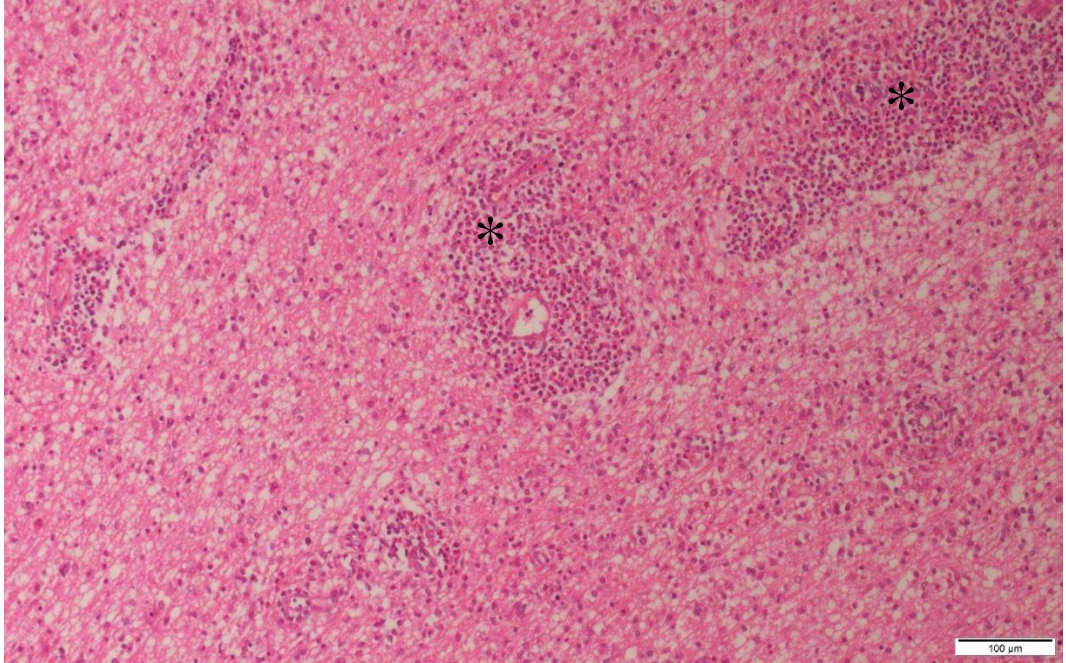
Şekil 4.2. Birden fazla odakta gözlenen ve yer yer birleşme eğiliminde mikroapse oluşumları (asterisk). H&E. Bar: 100 µm.



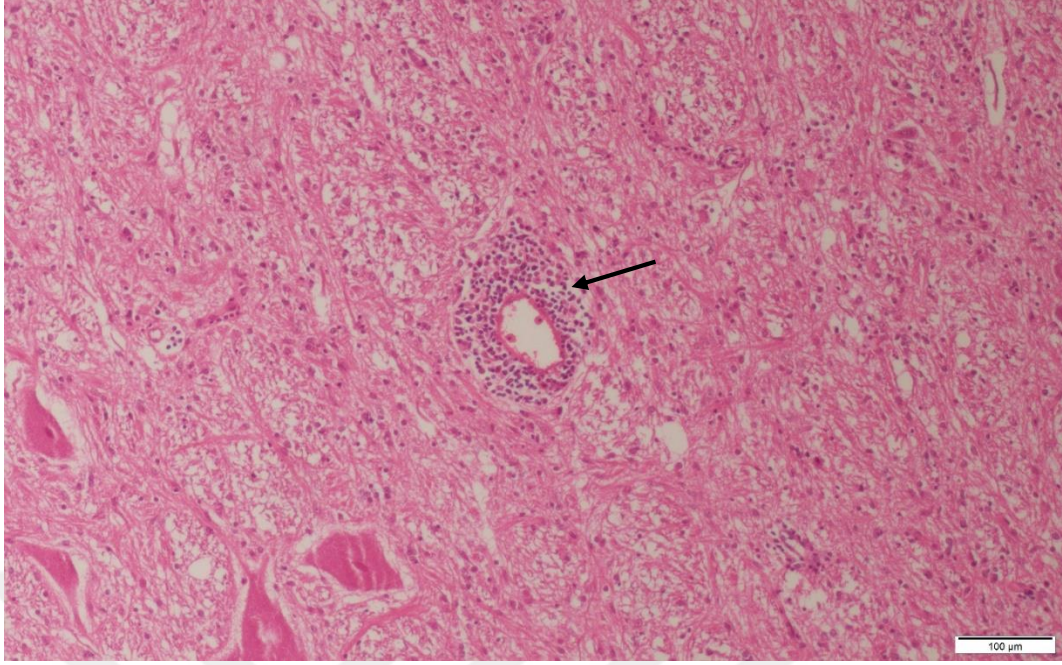
Şekil 4.3. Birkaç odakta gözlenen mikroapse oluşumları (asterisk) ve nöropile dağılmış durumda yangısal hücre infiltrasyonları. H&E. Bar: 100 µm.



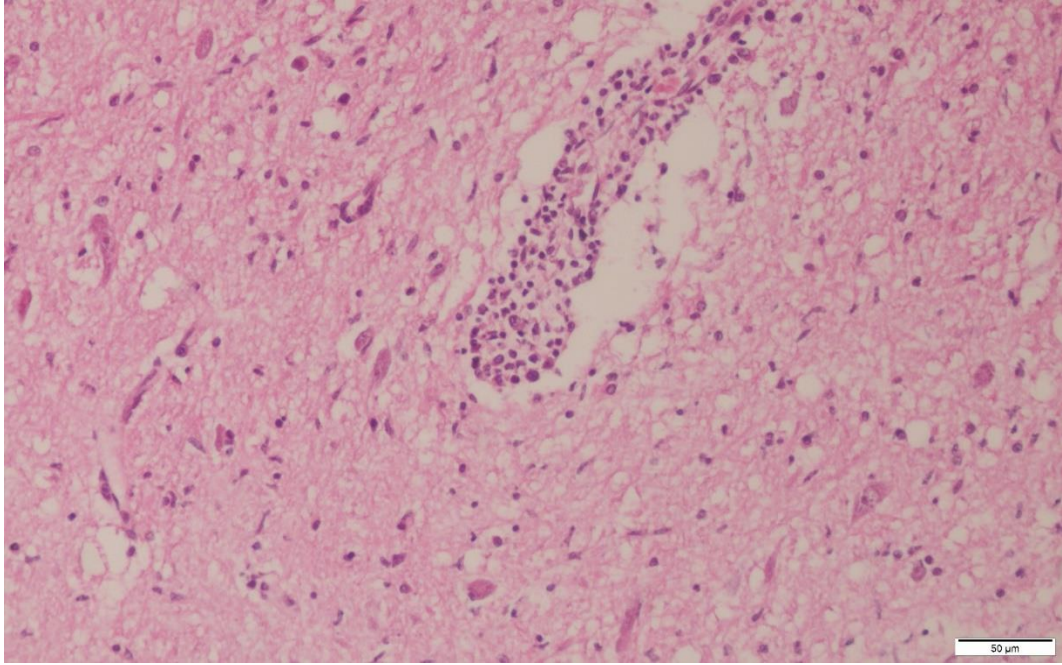
Şekil 4.4. Tek bir odakta gözlenen mikroapse oluşumu (asterisk). H&E. Bar: 100 µm.



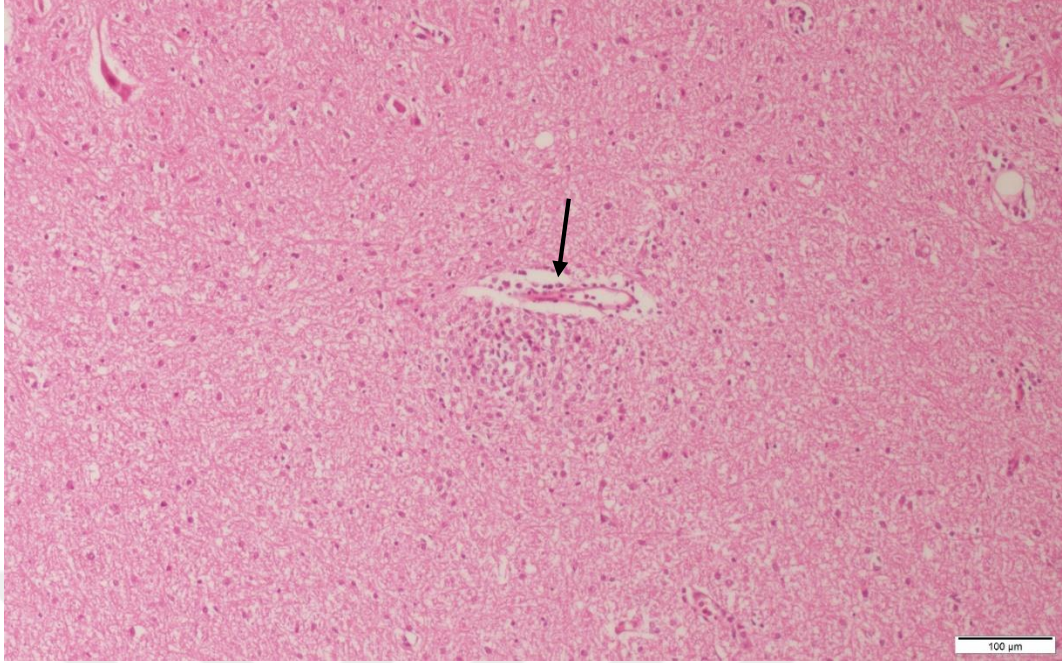
Şekil 4.5. Şiddetli perivasküler hücre infiltrasyonları (asteriskler). H&E. Bar: 100 µm.



Şekil 4.6. Orta şiddette perivasküler hücre infiltrasyonu (ok). H&E. Bar: 100 µm.



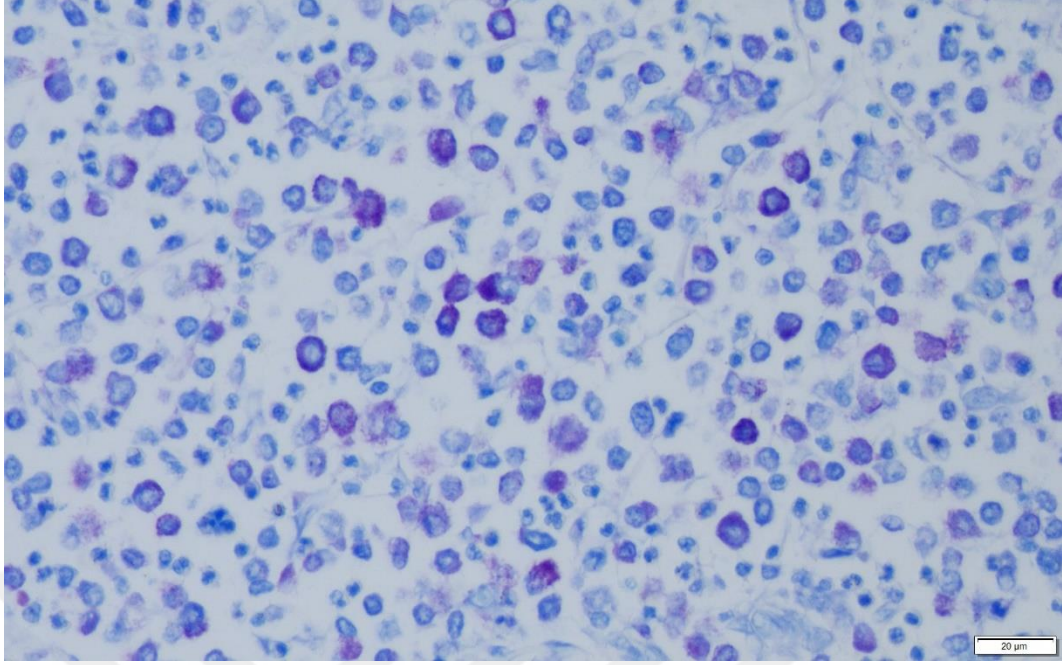
Şekil 4.7. Hafif şiddette perivasküler hücre infiltrasyonu. H&E. Bar: 50 µm.



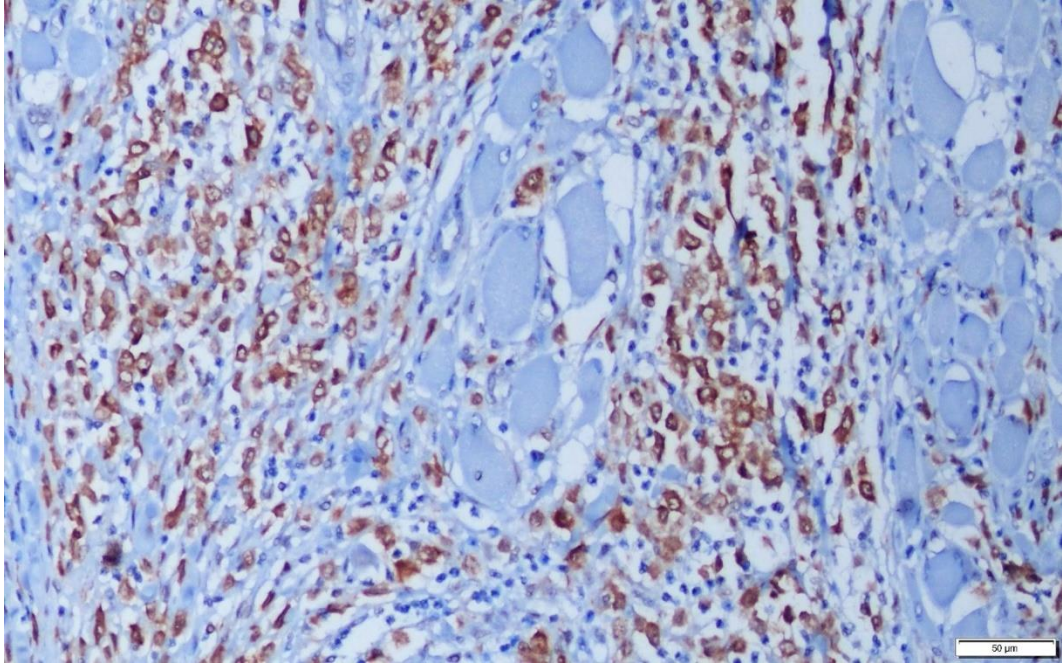
Şekil 4.8. Çok hafif şiddette perivasküler hücre infiltrasyonu (ok). H&E. Bar: 100 µm.

4.2. Histokimyasal ve İmmunohistokimyasal Bulgular

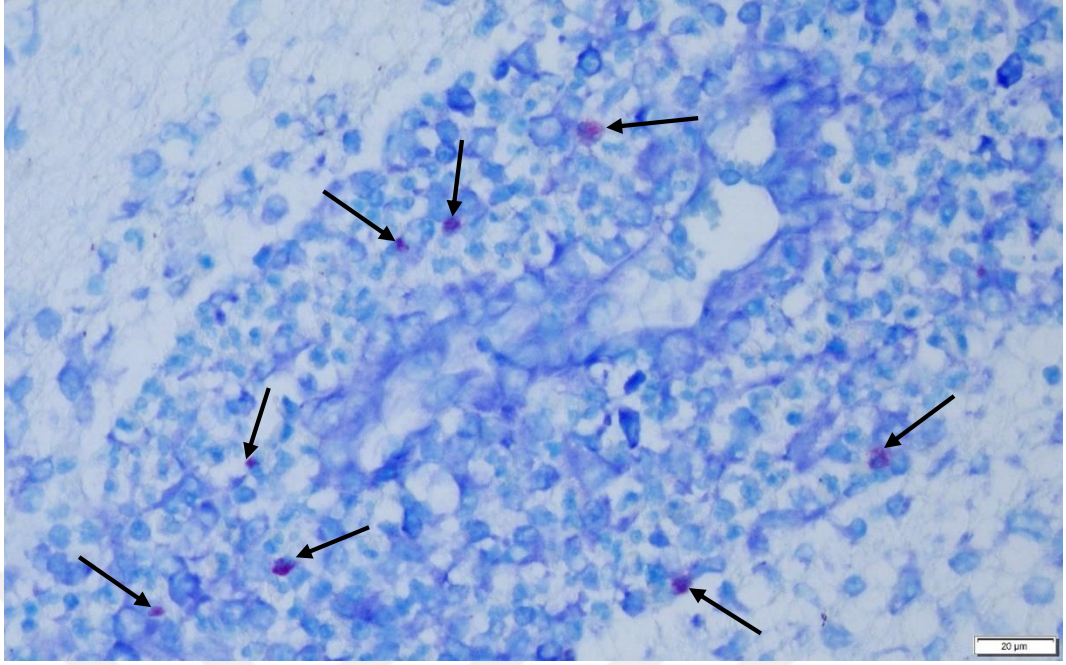
Toluidine blue boyaması ile triptaz boyaması sonrasında yapılan incelemelerde pozitiflik gösteren mast hücreleri sayıldı. Pozitif kontrol dokularında toluidine blue ve triptaz pozitifliği doğrulandı (Şekil 4.9 ve 4.10). Listeria pozitif grupta toluidine blue (TB) pozitif mast hücre sayıları 2-30 arasında belirlendi (Şekil 4.11. – 3.13.). Triptaz pozitif hücrelerin sayısı ise 1-28 arasında olarak belirlendi (Şekil 4.14. - 4.16.). TB pozitif hücre sayıları ile triptaz pozitif hücre sayıları toplanarak herbir vaka için toplam mast hücre sayıları belirlendi. Bu sayılar ise Listeria pozitif vakalarda 7-58 arasında olarak bulundu. Bu rakamlardan yola çıkarak 1-4 arasında skorlamalar yapıldı. Buna göre 0-7 mast hücresi skor 1, 8-14 mast hücresi skor 2, 15-21 mast hücresi skor 3 ve 22> mast hücresi skor 4 olarak skorlandı. Total skor bazında değerlendirildiğinde mast hücre skoru dört olguda 4, altı olguda 3, sekiz olguda 2 ve bir olguda 1 olarak belirlendi. Kontrol grubunda ise pozitif hücre sayılarının yalnızca bir vakada skoru 2, diğer vakalarda ise mast hücre skoru 1 olarak belirlendi (Şekil 4.17. ve 4.18.).



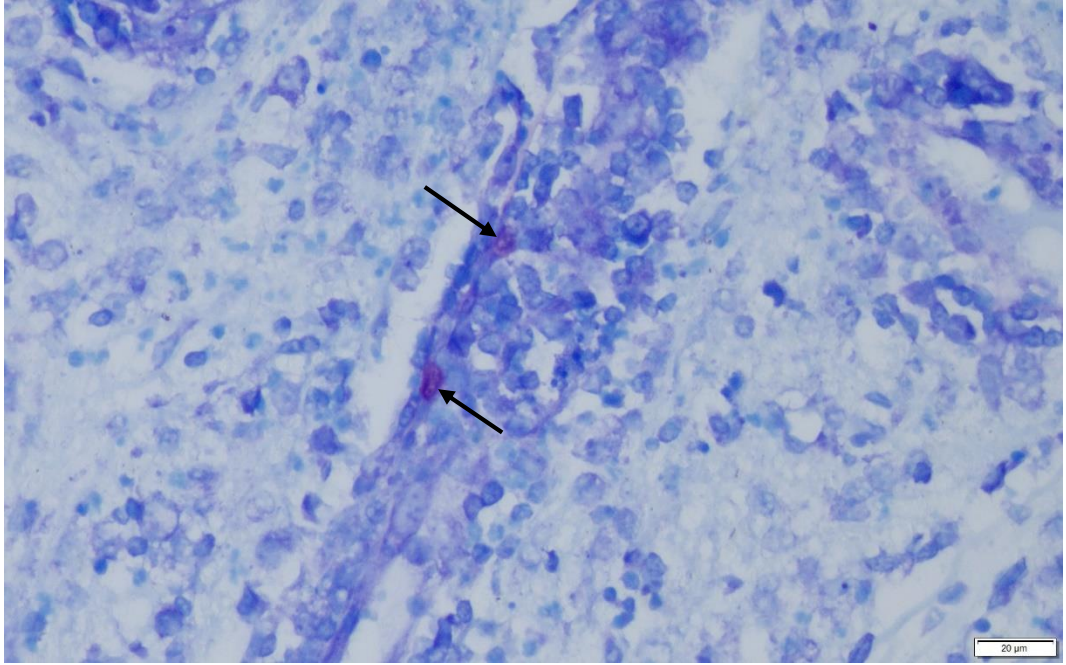
Şekil 4.9. Pozitif kontrol. Köpek mast hücre tümöründe çok sayıda mast hücresi. Toluidine Blue. Bar: 20 µm.



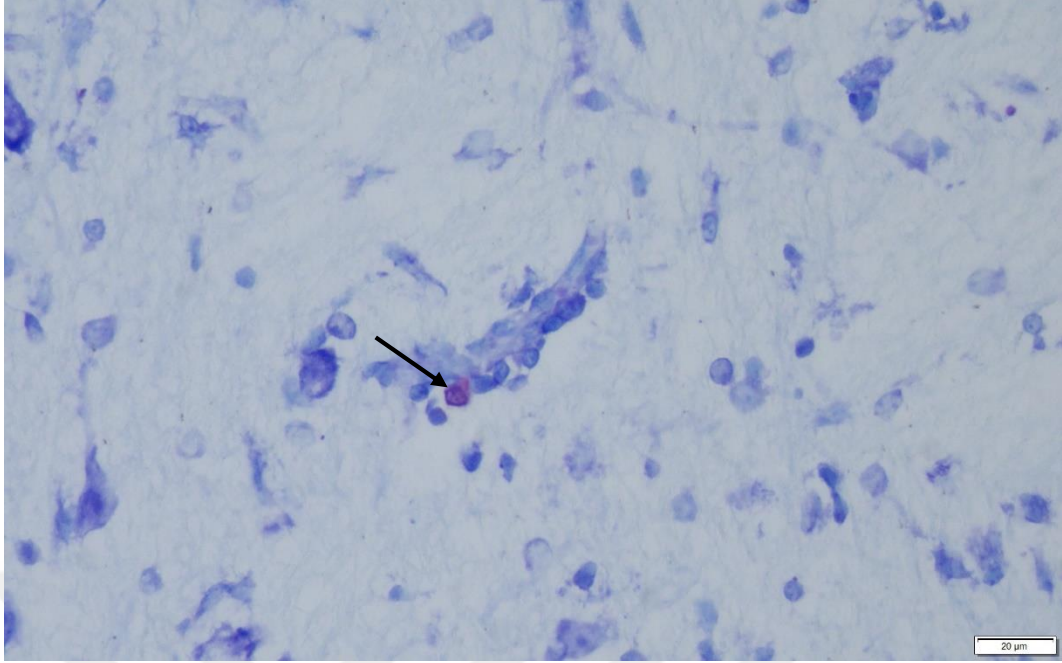
Şekil 4.10. Pozitif kontrol. Köpek dermal mast hücre tümöründe çok sayıda triptaz pozitif mast hücreleri. Avidin-biotin kompleks metot. DAB kromojen. Bar: 50 µm.



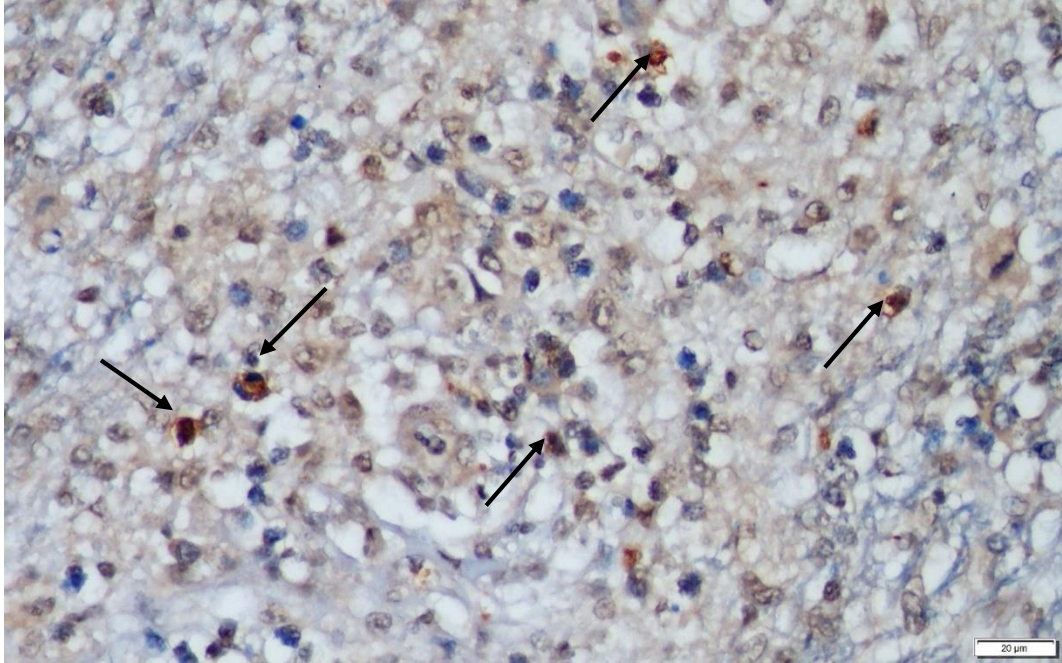
Şekil 4.11. Şiddetli enfekte beyin dokusunda perivasküler hücre infiltrasyonları arasında gözlenen çok sayıda mast hücresi (oklar). Toluidine blue. Bar: 20 μm.



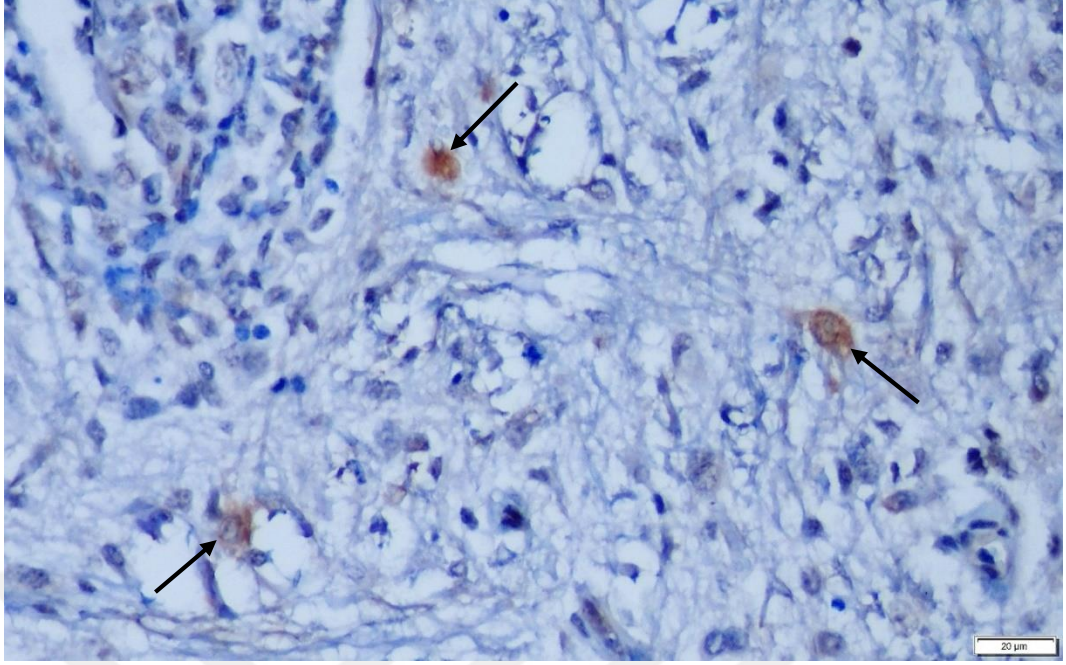
Şekil 4.12. Orta derecede enfekte beyin dokusunda perivasküler yerleşimli mast hücreleri (oklar). Toluidine Blue. Bar: 20 μm.



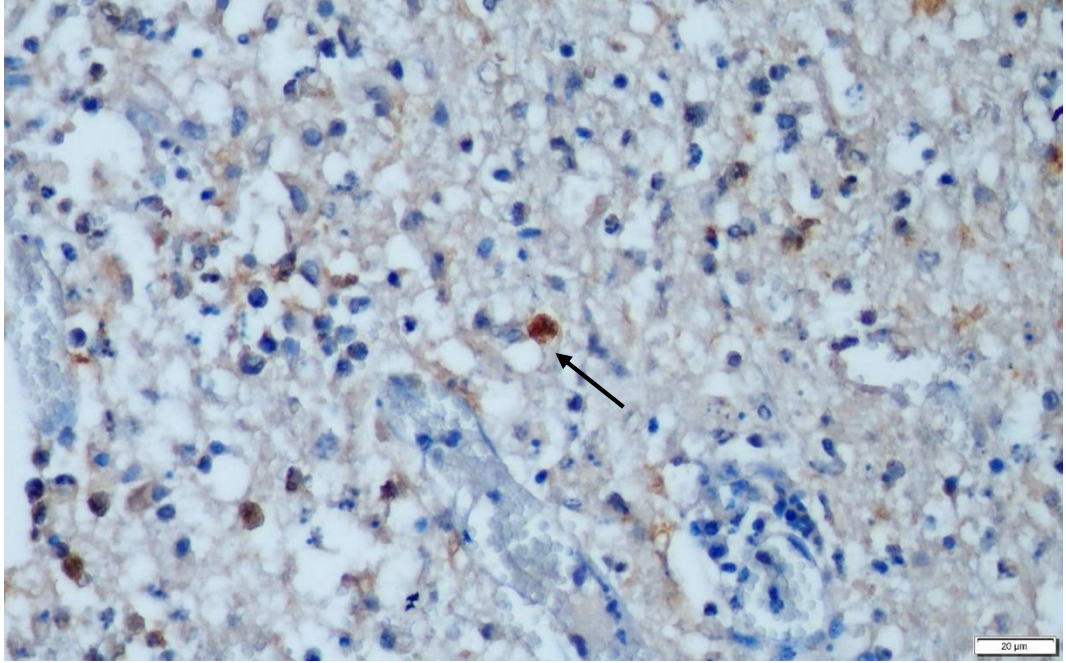
Şekil 4.13. Hafif şiddette enfekte beyin dokusunda perivasküler yerleşimli mast hücresi (ok). Toluidine Blue. Bar: 20 µm.



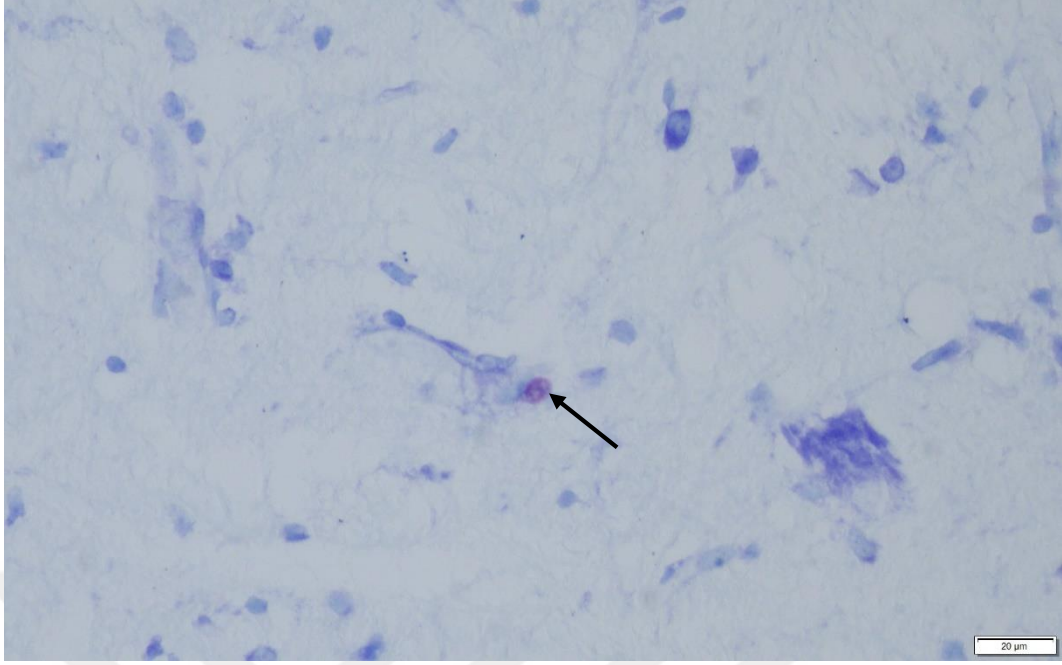
Şekil 4.14. Şiddetli enfekte beyin dokusunda çok sayıda Triptaz pozitif mast hücreleri (oklar). Avidin-biotin kompleks metot. DAB kromojen. Bar: 20 µm.



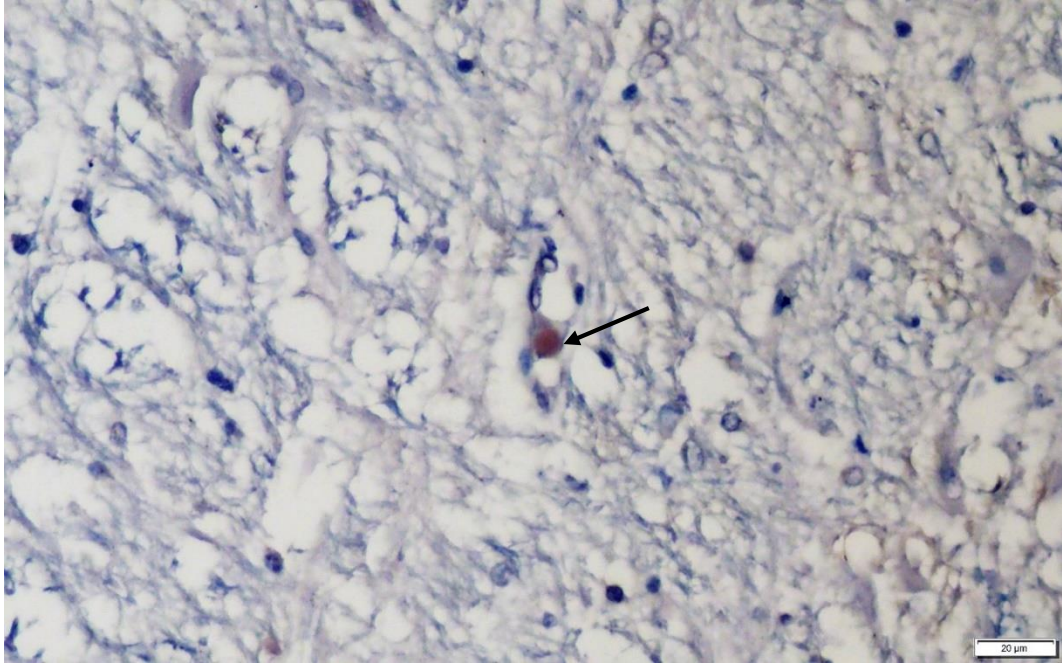
Şekil 4.15. Orta şiddette enfekte beyin dokusunda triptaz pozitif mast hücreleri (oklar). Avidin-biotin kompleks metot. DAB kromojen. Bar: 20 μm.



Şekil 4.16. Hafif şiddette enfekte beyin dokusunda triptaz pozitif mast hücresi (ok). Avidin-biotin kompleks metot. DAB kromojen. Bar: 20 μm.



Şekil 4.17. Normal beyin dokusunda perivasküler yerleşimli mast hücresi (ok). Toluidine Blue. Bar: 20 µm.



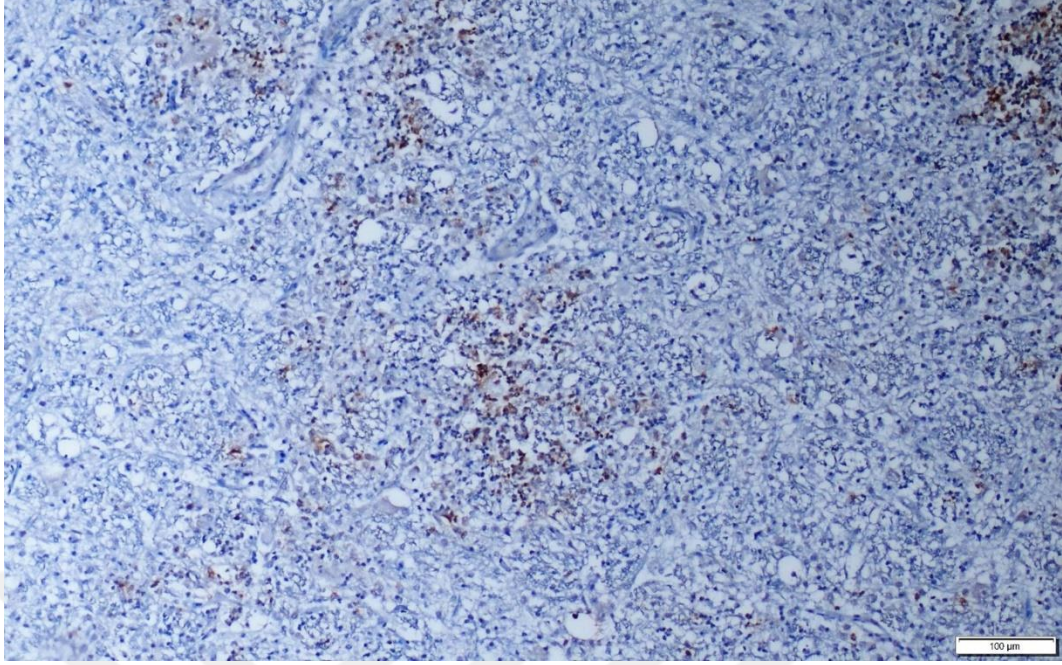
Şekil 4.18. Normal beyin dokusunda triptaz pozitif mast hücresi (ok). Avidin-biotin kompleks metot. DAB kromojen. Bar: 20 µm.

Listeria antikor ile boyanmış preparatlardan yapılan değerlendirmelerde *Listeria* grubundaki tüm hayvanlarda immunohistokimyasal olarak pozitiflik gözlemlendi. Pozitiflik dereceleri her bir vaka için 1 ile 4 arasında skorlandı. Dört olguda skor 4 (Şekil 4.19. ve 4.20.), beş olguda skor 3 (Şekil 4.21. ve 4.22.), iki olguda skor 2 (Şekil 4.23.) ve altı olguda skor 1 (Şekil 4.24.) olarak belirlendi. Tüm skor değerleri Tablo 4.1.'de özetlenmiştir.

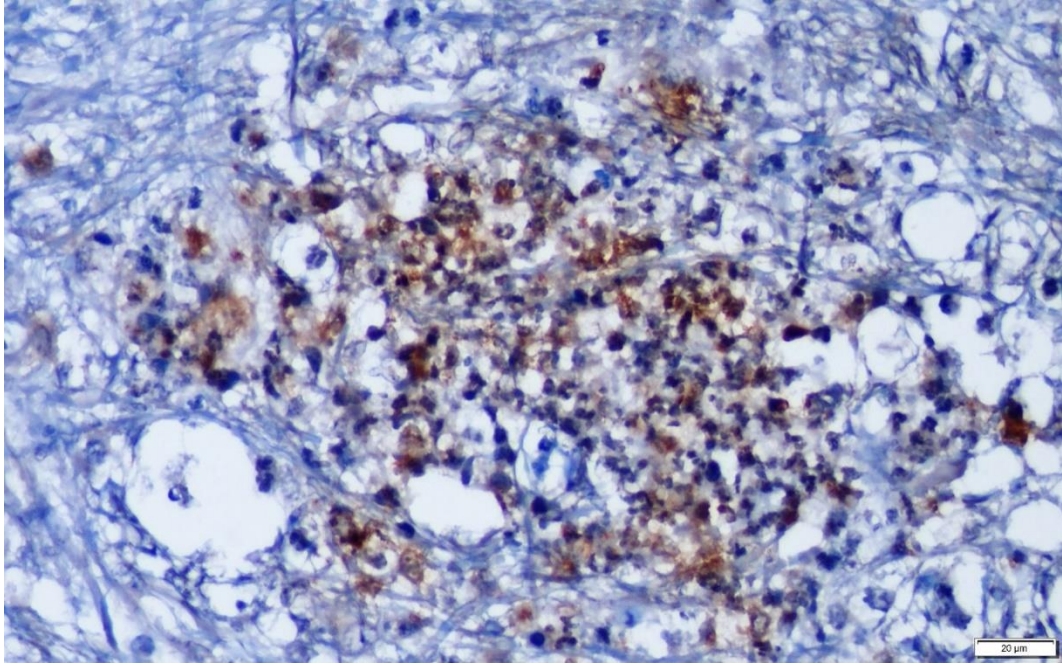
Tablo 4.1. Lezyonlara ait skor tablosu.

Grup	Baskın hücre	MA	Pİ	LmP	OS	MHS
1.	Nötrofil	3	2	3	3	3
2.	Mononükleer	1	3	1	2	2
3.	Nötrofil	4	4	1	3	4
4.	Mononükleer	1	1	1	1	1
5.	Nötrofil	3	2	2	2	3
6.	Mononükleer	2	3	2	2	2
7.	Nötrofil	3	4	1	2	3
8.	Mononükleer	4	3	4	4	4
9.	Nötrofil	4	4	4	4	3
10.	Mononükleer	3	3	3	3	2
11.	Nötrofil	4	4	3	4	4
12.	Mononükleer	3	3	1	3	2
13.	Mononükleer	3	4	4	4	3
14.	Mononükleer	2	2	3	3	4
15.	Mononükleer	4	3	1	3	2
16.	Mononükleer	3	2	4	3	2
17.	Mononükleer	2	4	3	3	2
Kontrol (n=7)	-	-	-	-	-	1
Kontrol (n=1)	-	-	-	-	-	2

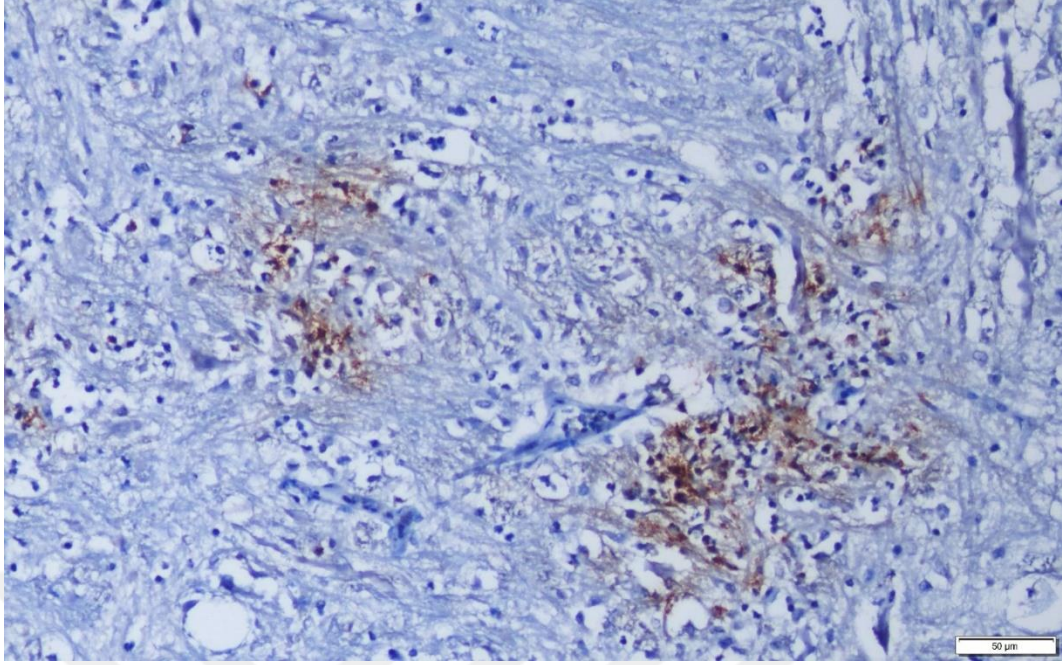
MA: Mikroapse, Pİ: Perivasküler infiltrasyon, LmP: *Listeria monocytogenes* pozitifliği, OS: Ortalama skor, MHS: Mast hücre skoru



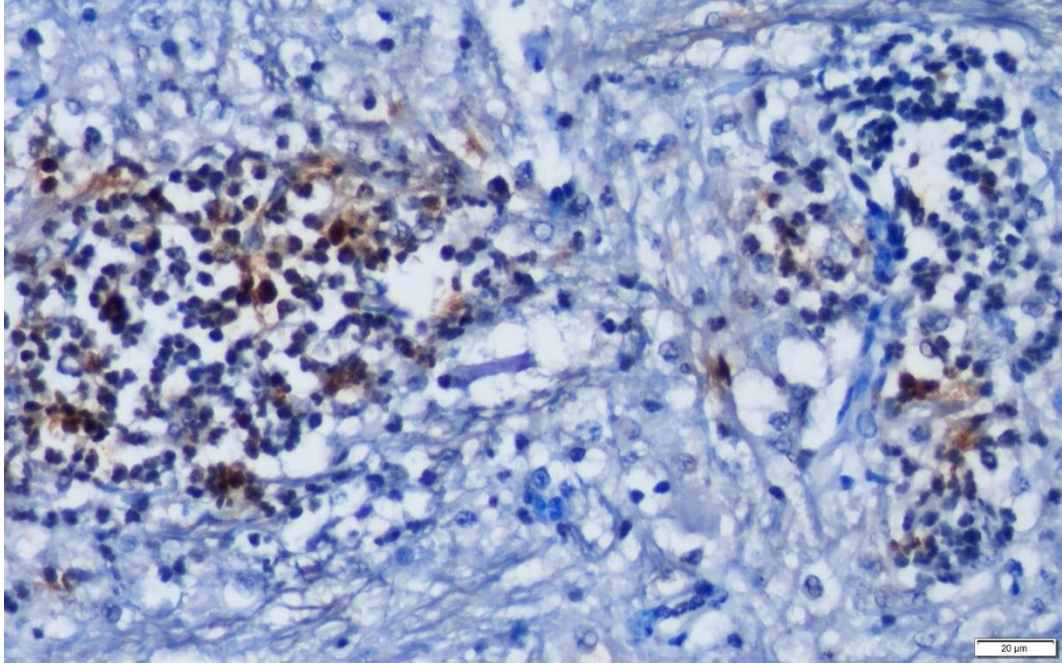
Şekil 4.19. Yoğun anti-Listeria antijen pozitifliği. Avidin-biotin kompleks metot. DAB kromojen. Bar: 100 µm.



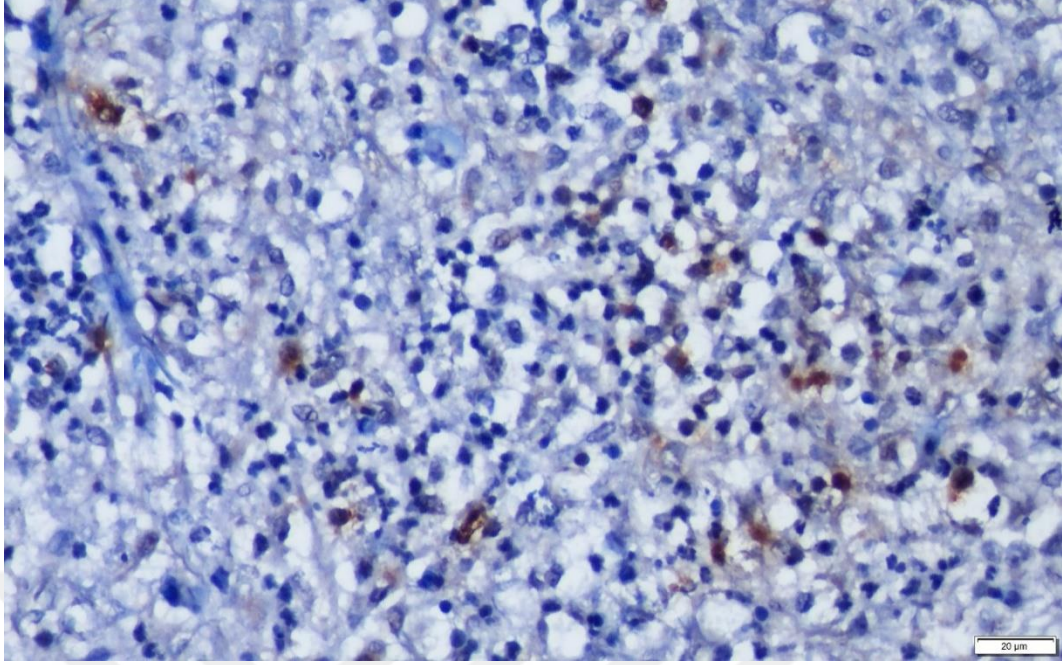
Şekil 4.20. Yoğun anti-Listeria antijen pozitifliği. Avidin-biotin kompleks metot. DAB kromojen. Bar: 20 µm.



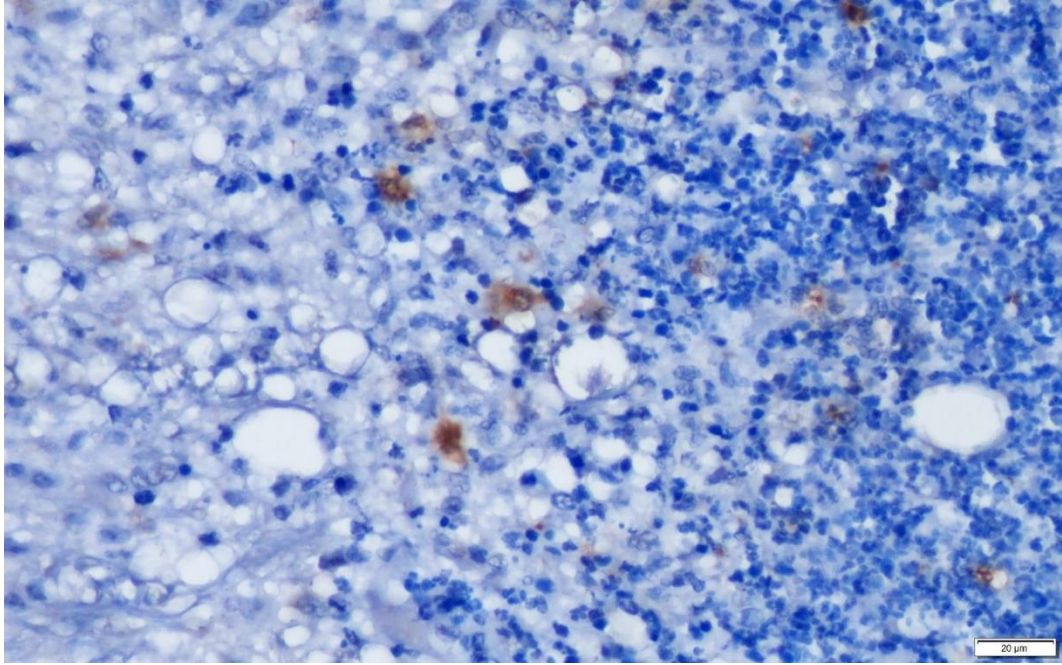
Şekil 4.21. Orta şiddette anti-Listeria antijen pozitifliği. Avidin-biotin kompleks metot. DAB kromojen. Bar: 50 µm.



Şekil 4.22. Orta şiddette anti-Listeria antijen pozitifliği. Avidin-biotin kompleks metot. DAB kromojen. Bar: 20 µm.



Şekil 4.23. Hafif dereceli anti-Listeria antijen pozitifliği. Avidin-biotin kompleks metot. DAB kromojen. Bar: 20 μ m.



Şekil 4.24. Çok hafif dereceli anti-Listeria antijen pozitifliği. Avidin-biotin kompleks metot. DAB kromojen. Bar: 20 μ m.

Histopatolojik skorlar ile mast hücre skorları arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için yapılan Pearson korelasyon testine göre; toplam lezyon skoru ile mast hücre skoru arasında %58,7'lik değerle pozitif korelasyon tespit edildi ($P<0,05$). Mikroapse ile mast hücreleri arasında da %57,6'lık değerle pozitif korelasyon belirlendi ($P<0,05$). Perivasküler infiltrasyon ile mast hücreleri arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilmedi ($P>0,05$). Son olarak Listeria yoğunluğu ile mast hücreleri arasında yapılan analizde de anlamlı bir korelasyon belirlenmedi ($P>0,05$). Listeria yoğunluğunun mikroapse ve perivasküler infiltrasyonlar ile arasında ayrı ayrı değerlendirildiğinde anlamlı bir korelasyon tespit edilmezken ($P>0,05$), toplam lezyon skoru ile karşılaştırıldığında %70,2'lik bir oranla güçlü bir korelasyon bulunduğu tespit edildi ($P<0,01$). Pearson korelasyon test sonuçları ve P değerleri Tablo 3.2'de sunulmuştur.

Tablo 4.2. Pearson korelasyon testi sonuçları

	Mast hücre	Mikroapse	Perivasküler İnfiltrasyon	Listeria Yoğunluğu
Mikroapse	0,576 0,016*			
Perivasküler İnfiltrasyon	0,363 0,152	0,471 0,056		
Listeria Yoğunluğu	0,335 0,188	0,299 0,244	0,109 0,678	
Total Lezyon Skoru	0,587 0,013*	0,717 0,001**	0,545 0,024*	0,702 0,002**

* $P<0,05$, ** $P<0,01$

Mast hücre yoğunluğunun normal ve enfekte beyinler arasındaki karşılaştırılmasında yapılan ikili T testine göre enfekte beyinlerdeki mast hücre sayısında kontrole göre anlamlı derecede artış görüldü ($P<0,01$). Mikroapselerdeki baskın hücre tipine göre yapılan ikili T testine göre de nötrofil lökositlerin baskın olarak bulunduğu beyinlerde mast hücre sayısının anlamlı şekilde yüksek olduğu belirlendi ($P<0,05$). Veriler Tablo 3.3'te sunulmuştur.

Tablo 4.3. Baskın hücreler arası ve kontrol/enfekte gruplar arası istatistiksel karşılaştırma.

Grup	Mast Hücre Yoğunluğu
Nötrofil	3,333±0,516*
Mononükleer	2,364±0,924*
Kontrol	1,125±0,354**
Enfekte	2,706±0,920**

*P<0,05; **P<0,01

5. TARTIŞMA

Mast hücreleri doğal immun sistemin primer efektör hücreleri arasında yer alır ve geniş doku yayılımları vardır. Özellikle deride, hava kanallarında ve gastrointestinal sistemde bulunurlar (Galli *ve ark.*, 2005). Mast hücreleri vücuda giren patojenlerle olasılıkla ilk temas eden hücrelerdir (Gekara ve Weiss, 2008). Aynı zamanda önceden oluşmuş yangısal mediatörleri sekresyona hazır halde bekleten tek hücrelerdir (Galli *ve ark.*, 1991; Galli ve Nakae, 2003; McLachlan *ve ark.*, 2003). Patojenlerle enfeksiyon sırasında mast hücreleri tarafından yangı uyarılır ve bu da enfeksiyonun sınırlandırılması ve kontrol altına alınmasında oldukça önemlidir (St. John ve Abraham, 2013). Senay ve arkadaşları (Senay *ve ark.*, 2020) farelerde çeşitli *L. monocytogenes* izolatlarının nörotropizmini değerlendirdikleri çalışmada histopatolojik olarak mikroapse oluşumu, perivasküler infiltrasyon, meningitis ve bakteri yoğunluğunu değerlendirmişlerdir. Özyıldız ve arkadaşları (Özyıldız *ve ark.*, 2018) listeriosisli koyun ve keçi beyinlerinde GAL-C, GFAP ve MBP'nin varlığını değerlendirdikleri çalışmada histopatolojik olarak mikroapse, gliozis, nöronal dejenerasyon ve nekroz, perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonu ve meningitis açısından skorlamalar yapmışlardır. Bu değerlendirmelerini beyin kökü, orta beyin ve beyincik olarak ayrı ayrı ele almışlar ve toplam lezyon skoru belirlemişlerdir. Biz çalışmamızda bu iki çalışmada uygulanan metotları modifiye ettik. Mikroapse ve perivasküler infiltrasyonların skorlamasını Senay ve arkadaşlarının çalışmasını temel olarak gerçekleştirdik. Listeria yoğunluğunu değerlendirirken ise Gram boyamanın yerine immunohistokimyasal olarak Listeria pozitif olarak gözlenen alanları skorladık. Bu çalışmadan farklı olarak fakat Özyıldız ve arkadaşlarının çalışmasına benzer şekilde elde ettiğimiz skorların ortalamasını alarak toplam lezyon skorunu belirledik.

Mast hücreleri beyinde de az sayıda da olsa mevcuttur (Silver *ve ark.*, 1996). Beyindeki mast hücreleri, hem nöral hem de vasküler yanıtları başlatmak için ideal olarak konumlandırılmış olup, kan-beyin bariyerinin beyin tarafındaki beyin zarları ve perivasküler alana lokalize edilmiştir (Forsythe, 2019). Çalışılan çoğu türde mast hücrelerinin tipik olarak üçüncü ventrikülün çevresinde, talamik/hipotalamik bölge parankiminde ve koroid pleksusta lokalize olduğu bildirilmektedir (Porzionato *ve ark.*, 2004). Memelilerde mast hücreleri en yaygın olarak dorsal talamusta bulunur

(Florenzano ve Bentivoglio, 2000). Beyindeki mast hücreleri sabit değildir ve sayıları, dağılımları ve aktivasyon durumları çeşitli çevresel uyaranlara yanıt olarak belirgin ölçüde değişir (Cirulli *ve ark.*, 1998; Kriegsfeld *ve ark.*, 2003). Nitekim Silverman ve arkadaşları (Silverman *ve ark.*, 2000) ratlarda peritoneal mast hücreleri pürifiye ettikten sonra bu hücreleri PKH26 veya CellTracker Green canlı boyaları ile işaretlemiş ve bunları konak hayvanlara enjekte etmişler, bir saat sonra bu işaretli mast hücrelerini talamik kan damarlarına yakın şekilde gözlemişlerdir. Beyne göç eden mast hücrelerinin toplam mast hücre popülasyonunda ~%2-20 oranında bulunduğunu ve buradan yola çıkarak mast hücrelerinin damarlardan beyne göç ettiğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda normal beyin dokularında mast hücre sayısının enfekte beyinlere göre anlamlı derecede düşük olduğu gözlemlendi. Ayrıca enfekte beyin dokularında mast hücrelerinin özellikle yangılı alanlarda artış gösterdiği ve nispeten normal olan beyin bölümlerinde de kontrol beyinlerinde olduğu gibi düşük sayıda olduğu görüldü. Bu artışın daha önce bildirilen şekilde mast hücrelerinin enfekte olan beyin bölgelerine göçü ile şekillenmiş olması mümkün görünmektedir.

Gekara ve Weiss (Gekara ve Weiss, 2008) farelerde *Listeria monocytogenes* tarafından oluşturulan peritonitis modelinde mast hücrelerinin enfeksiyon kontrolünde önemli rollerinin olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmalarında enfeksiyonun başlangıcında etkenlerin fagositozunun mast hücreleri tarafından değil, nötrofiller ve makrofajlar tarafından gerçekleştiğini görmüşlerdir. Bununla beraber mast hücrelerinden yoksun farelerde etkenin kontrolünün bozulduğunu gözlemişlerdir. Buradan yola çıkarak da mast hücrelerinin *Listeria monocytogenes* enfeksiyonunu takiben hızlıca degranüle olduğunu ve böylece TNF-alfa gibi salınan pro-inflamatuar mediatörlerin nötrofilleri enfeksiyon bölgesine çektiğini belirtmişlerdir. Yangı hücrelerinin bölgeye çekilmesinin ardından TNF-alfa aynı zamanda nötrofillerin bakterisidal aktivitelerini artırarak bakterilerin ortadan kaldırılmasını kolaylaştırır (Malaviya ve Abraham, 2001). Çalışmamızda mast hücre yoğunlukları ile total lezyon şiddeti arasında, özellikle de mikroapse oluşumları ile yüksek derecede pozitif bir korelasyon gözlenmiştir. Perivasküler hücre infiltrasyonlarının *Listeria* yoğunluğu ile arasında ise anlamlı bir korelasyon gözlenmemiştir. Bu da mast hücrelerinin sayıca artışının parenkimal lezyonlarda daha belirgin bir şiddetlenmeye neden olabileceğini göstermektedir. *Listeria* yoğunluğunun lezyon şiddetine doğrudan yüksek oranda katkı

yaptığı görülmektedir. Bu da etken uyarımına bağlı olarak lezyon şiddetinin beklendiği gibi arttığını göstermektedir.

Mast hücrelerinden salınan TNF-alfanın yanında lökotrienler veya triptaz gibi proteazların da nötrofillerin mobilizasyonunda önemli rollerinin olduğu tanımlanmıştır (Zhang *ve ark.*, 1992; Malaviya *ve ark.*, 1993; Malaviya ve Abraham, 2000). Mast hücrelerinin yangıyı aktive etmelerinin yanında direk olarak fagositozis veya mast hücre ekstraselüler tuzakları (MCETs) ile patojenlerin yok edilmesi görevleri de vardır. MCETs antimikrobiyel peptidleri, histonları ve granüler proteinleri içeren nükleer DNA yapılarıdır. Bu yapıların farklı tipteki ekstraselüler bakterileri tuzağa düşürüp, onları antimikrobiyel bileşiklere maruz bırakması söz konusudur (Von Köckritz-Blickwede *ve ark.*, 2008). Campillo-Navarro ve arkadaşları (Campillo-Navarro *ve ark.*, 2017) *L. monocytogenes* ile enfeksiyon sonrasında MCETs denilen DNA'lar salındığını ve bu DNA'ların histon ve triptaz ile kompleks olduğunu bildirmişlerdir. Yazarlar *L. monocytogenes* uyarımlı mast hücrelerinden salınan bu mikrobisidal mast hücresi ekstraselüler tuzaklarının varlığını ve mast hücrelerinin bu enfeksiyonda yalnızca yangısal uyarımda rol oynamayıp aynı zamanda etkenle direk mücadelede rol alabileceğini rapor etmişlerdir. Ayrıca MCETs'lerin beta-hexosaminidase aktivitesi PUGNAc ile bloke edildiğinde, bakteriyel büyümenin baskılanmasında bir kayıp olduğunu gözlemişler ve beta-hexosaminidase'ın MCETs antibakteriyel aktivitesine katkı sağladığını bildirmişlerdir. Gekara ve Weiss (Gekara ve Weiss, 2008) *L. monocytogenes* ile enfeksiyon sonrası 3 saatte mast hücreleriyle ilişkili nötrofil desteğinin şekillendiğini ve mast hücre sayılarının da bu süreçte sabit kaldığını belirtmişlerdir. Campillo-Navarro ve arkadaşları da (Campillo-Navarro *ve ark.*, 2017) *L. monocytogenes* enfeksiyonu sonrası 2 saat içerisinde MCETs üretiminin şekillendiğini ve bu yönleriyle etkenle mücadelede mast hücrelerinin akut dönemde rollerinin olduğunu fakat yerleşik özelliklerinden dolayı immuniteye dair rollerinin daha fazla aydınlatılmaya ihtiyaç duyulduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda mikroapsellerdeki baskın hücreler açısından değerlendirme yapıldığında nötrofil baskın mikroapselere sahip olan beyin dokularında mast hücrelerinin mononükleer hücre baskın olanlara göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum yukarıda sözü edilen bilgilerle uyumlu olarak mast hücrelerinin *L. monocytogenes* ile enfeksiyonun akut döneminde daha belirgin şekilde artış gösterdiğine işaret

etmektedir. Yine çalışmamızda mast hücre sayısının Listeria yoğunluğu ile ilişkisine bakıldığında korelasyonun düşük olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir. Total lezyon skoru ile Listeria etkeni yoğunluğu arasında ise arasında oldukça güçlü bir korelasyon gözlenmiştir. Bu durum yangının şiddetinin artmasından ziyade, artan mast hücre yoğunluklarının Listeria yoğunluğunun azalmasında etkili olabileceğini göstermektedir. Nitekim MCETs ile ilgili bilgiler dikkate alındığında mast hücrelerinin yangısal uyarımın yanında etkenleri direk olarak yıkımlama kabiliyetlerinin ön planda olduğu düşünülebilir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Mast hücreleri ve glia hücreleri ile yangısal mediatörlerin salınımı arasındaki sürekli pozitif geri besleme mekanizmasından dolayı, az sayıda mast hücreleri dahi beyinde önemli derecede nöroinflamasyonu uyarabilir (Hendriksen *ve ark.*, 2017; Gupta ve Harvima, 2018). Çalışmamızda da mast hücre yoğunluğunun lezyonların şiddetinin artışıyla pozitif bir korelasyonunun olduğu gözlenmiştir. Mast hücrelerinin nöroinflamasyona katkıları iyi bilinmekle beraber, beyin mast hücrelerinin homeostatik fonksiyonlarını anlamak için henüz bilgiler çok sınırlıdır (Forsythe, 2019). Mast hücre kökenli proteazlar ve proteoglikanlar, özellikle de heparin ve kondroitin sülfat beyin zedelenmesini takiben oluşan yangıyla ilişkili nörodejenerasyona karşı koruyucu olabilir (Zhang *ve ark.*, 2011; Nelissen *ve ark.*, 2013). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre artan mast hücre yoğunluğunun etken düzeyinde azalmayla ilişkisi olsa da, oluşan lezyonlar açısından özellikle de akut dönemde şiddeti artırıcı bir rolünün olduğunu söyleyebiliriz. Listeriozisli koyunlarda mast hücrelerinin beyin dokusundaki lezyonlarla ve etkenle mücadeleyle ilişkisinin moleküler düzeyde daha yüksek sayıda örnek üzerinde yapılacak çalışmalarla net olarak ortaya konulabilmesi mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

- Abel J, Goldmann O, Ziegler C, Höltje C, Smeltzer MS, Cheung AL, Bruhn D, Rohde M, Medina E (2011).** Staphylococcus aureus evades the extracellular antimicrobial activity of mast cells by promoting its own uptake. Staphylococcus aureus evades the extracellular antimicrobial activity of mast cells by promoting its own uptake. *J. Innate Immun.*, **3**(5), 495–507.
- Arock M, Ross E, Lai-Kuen R, Averlant G, Gao Z, Abraham SN (1998).** Phagocytic and tumor necrosis factor alpha response of human mast cells following exposure to gram-negative and gram-positive bacteria. Phagocytic and tumor necrosis factor alpha response of human mast cells following exposure to gram-negative and gram-positive bacteria. *Infect. Immun.*, **66**(12), 6030–6034.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A (2004).** Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*, **303**(5663), 1532–1535.
- Campero CM, Odeón AC, Cipolla AL, Moore DP, Poso MA, Odriozola E (2002).** Demonstration of *Listeria monocytogenes* by immunohistochemistry in formalin-fixed brain tissues from natural cases of ovine and bovine encephalitis. Demonstration of *Listeria monocytogenes* by immunohistochemistry in formalin-fixed brain tissues from natural cases of ovine and bovine encephalitis. *J. Vet. Med. B.*, **49**(8), 379–383.
- Campillo-Navarro M, Chávez-Blanco AD, Wong-Baeza I, Serafín-López J, Flores-Mejía R, Estrada-Parra S, Estrada-García I, Chacón-Salinas R (2014).** Mast cells in lung homeostasis: Beyond type I hypersensitivity. Mast cells in lung homeostasis: Beyond type I hypersensitivity. *Curr. Respir. Med. Rev.*, **10**, 115–123.
- Campillo-Navarro M, Leyva-Paredes K, Donis-Maturano L, González-Jiménez M, Paredes-Vivas Y, Cerbulo-Vázquez A, Serafín-López J, García-Pérez B,**

Ullrich SE, Flores-Romo L, Pérez-Tapia SM, Estrada-Parra S, Estrada-García I, Chacón-Salinas R (2017). Listeria monocytogenes induces mast cell extracellular traps. Listeria monocytogenes induces mast cell extracellular traps. *Immunobiology*, **222**(2), 432–439.

Carter G (1984). *Diagnostic procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology*. USA: Blackwell Science.

CFSAN (2001). Draft Assessment of the Relative Risk to Public Health from Food borne Listeria monocytogenes Among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods. Draft Assessment of the Relative Risk to Public Health from Food borne Listeria monocytogenes Among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods. Available at: <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmrisksu.html> [Accessed 2001]

Chacon-Salinas R, Chen L, Chavez-Blanco AD, Limon-Flores AY, Ma Y, Ullrich SE (2014). An essential role for platelet-activating factor in activating mast cell migration following ultraviolet irradiation. An essential role for platelet-activating factor in activating mast cell migration following ultraviolet irradiation. *J. Leukoc. Biol.*, **95**(1), 139–148.

Chacón-Salinas R, Limón-Flores AY, Chávez-Blanco AD, Gonzalez-Estrada A, Ullrich SE (2011). Mast Cell-Derived IL-10 Suppresses Germinal Center Formation by Affecting T Follicular Helper Cell Function. Mast Cell-Derived IL-10 Suppresses Germinal Center Formation by Affecting T Follicular Helper Cell Function. *J. Immunol.*, **186**(1), 25–31.

Cirulli F, Pistillo L, De Acetis L, Alleva E, Aloe L (1998). Increased number of mast cells in the central nervous system of adult male mice following chronic subordination stress. Increased number of mast cells in the central nervous system of adult male mice following chronic subordination stress. *Brain Behav. Immun.*, **12**(2), 123–133.

Drevets DA, Bronze MS. (2008). Listeria monocytogenes: Epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. Listeria monocytogenes: Epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS*

Immunol. Med. Microbiol., **53**(2), 151–165.

Drevets DA, Canono BP, Campbell PA (1992). Listericidal and nonlistericidal mouse macrophages differ in complement receptor type 3-mediated phagocytosis of *L. monocytogenes* and in preventing escape of the bacteria into the cytoplasm. Listericidal and nonlistericidal mouse macrophages differ in complement receptor type 3-mediated phagocytosis of *L. monocytogenes* and in preventing escape of the bacteria into the cytoplasm. *J. Leukoc. Biol.*, **52**(1), 70–79.

Drevets DA, Leenen PJM, Greenfield RA (2004). Invasion of the Central Nervous System by Intracellular Bacteria. Invasion of the Central Nervous System by Intracellular Bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.*, **17**(2), 323–347.

Florenzano F, Bentivoglio M (2000). Degranulation, density, and distribution of mast cells in the rat thalamus: A light and electron microscopic study in basal conditions and after intracerebroventricular administration of nerve growth factor. Degranulation, density, and distribution of mast cells in the rat thalamus: A light and electron microscopic study in basal conditions and after intracerebroventricular administration of nerve growth factor. *J. Comp. Neurol.*, **424**(4), 651–669.

Forsythe P (2019). Mast Cells in Neuroimmune Interactions. Mast Cells in Neuroimmune Interactions. *Trends Neurosci.*, **42**(1), 43–55.

Galli SJ, Nakae S (2003). Mast cells to the defense. Mast cells to the defense. *Nat. Immunol.*, **4**(12), 1160–1162.

Galli SJ, Gordon JR, Wershil BK (1991). Cytokine production by mast cells and basophils. Cytokine production by mast cells and basophils. *Curr. Opin. Immunol.*, **3**(6), 865–873.

Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, Piliponsky AM, Williams CMM, Tsai M (2005). Mast cells as ‘tunable’ effector and immunoregulatory cells: Recent advances. Mast cells as ‘tunable’ effector and immunoregulatory cells:

Recent advances. *Annu. Rev. Immunol.*, **23**, 749–786.

- Gekara NO, Weiss S (2008).** Mast cells initiate early anti-Listeria host defences. Mast cells initiate early anti-Listeria host defences. *Cell. Microbiol.*, **10**(1), 225–36.
- Gupta K, Harvima IT (2018).** Mast cell-neural interactions contribute to pain and itch. Mast cell-neural interactions contribute to pain and itch. *Immunol. Rev.*, **282**(1), 168–187.
- Hamon M, Bierne H, Cossart P (2006).** Listeria monocytogenes: A multifaceted model. Listeria monocytogenes: A multifaceted model. *Nat. Rev. Microbiol.*, **4**(6), 423–434.
- Hendriksen E, van Bergeijk D, Oosting RS, Redegeld FA (2017).** Mast cells in neuroinflammation and brain disorders. Mast cells in neuroinflammation and brain disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **79**, 119–133.
- Hirsh C, Zee C (1999).** *Veterinary Microbiology*. USA: Blackwell Science.
- Hirsh C, Maclachlan J, Walklers L (2004).** *Veterinary Microbiology*. USA: Blackwell publishing.
- Ireton K (2007).** Entry of the bacterial pathogen Listeria monocytogenes into mammalian cells. Entry of the bacterial pathogen Listeria monocytogenes into mammalian cells. *Cell. Microbiol.*, **9**(6), 1365–1375.
- Jacquet C, Doumith M, Gordon JI, Martin PMV, Cossart P, Lecuit M (2004).** A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne Listeria monocytogenes. A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne Listeria monocytogenes. *J. Infect. Dis.*, **189**(11), 2094–2100.
- Jobbings CE, Sandig H, Whittingham-Dowd JK, Roberts IS, Bulfone-Paus S (2013).** Listeria monocytogenes Alters Mast Cell Phenotype, Mediator and Osteopontin Secretion in a Listeriolysin-Dependent Manner. Listeria monocytogenes Alters Mast Cell Phenotype, Mediator and Osteopontin

Secretion in a Listeriolysin-Dependent Manner. *PLoS ONE*, **8**(2), 1–11.

St. John AL, Abraham SN. (2013). Innate Immunity and Its Regulation by Mast Cells. Innate Immunity and Its Regulation by Mast Cells. *J. Immunol.*, **190**(9), 4458–4463.

St. John AL, Rathore APS, Yap H, Ng ML, Metcalfe DD, Vasudevan SG, Abraham SN (2011). Immune surveillance by mast cells during dengue infection promotes natural killer (NK) and NKT-cell recruitment and viral clearance. Immune surveillance by mast cells during dengue infection promotes natural killer (NK) and NKT-cell recruitment and viral clearance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **108**(22), 9190–9195.

Johnson GC, Fales WH, Maddox CW, Ramos-Vara JA (1995). Evaluation of laboratory tests for confirming the diagnosis of encephalitic listeriosis in ruminants. Evaluation of laboratory tests for confirming the diagnosis of encephalitic listeriosis in ruminants. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **7**(2), 223–228.

Kahn H, Line S (2005). *The Merck Veterinary Manual*. Philadelphia: National Publishing Inc.

Von Köckritz-Blickwede M, Goldmann O, Thulin P, Heinemann K, Norrby-Teglund A, Rohde M, Medina E (2008). Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood*, **111**(6), 3070–3080.

Kocks C, Guoin E, Tabouret M, Berche P, Ohayon H, Cossart P (1992). L. monocytogenes-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. L. monocytogenes-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell*, **68**(3), 521–531.

Kriegsfeld LJ, Hotchkiss AK, Demas GE, Silverman AJ, Silver R, Nelson RJ (2003). Brain mast cells are influenced by chemosensory cues associated with estrus induction in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*). Brain mast cells

are influenced by chemosensory cues associated with estrus induction in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Horm. Behav.*, **44**(5), 377–384.

Lopes JP, Stylianou M, Nilsson G, Urban CF (2015). Opportunistic pathogen *Candida albicans* elicits a temporal response in primary human mast cells. Opportunistic pathogen *Candida albicans* elicits a temporal response in primary human mast cells. *Sci. Rep.*, **5**.

Malaviya R, Abraham SN (2000). Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis. Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis. *J. Leukoc. Biol.*, **67**(6), 841–846.

Malaviya R, Abraham SN (2001). Mast cell modulation of immune responses to bacteria. Mast cell modulation of immune responses to bacteria. *Immunol. Rev.*, **179**, 16–24.

Malaviya R, Ikeda T, Ross E, Abraham SN (1996). Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF- α . Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF- α . *Nature*, **381**(6577), 77–80.

Malaviya R, Malaviya R, Jakschik BA (1993). Reversible translocation of 5-lipoxygenase in mast cells upon IgE/antigen stimulation. Reversible translocation of 5-lipoxygenase in mast cells upon IgE/antigen stimulation. *J. Biol. Chem.*, **268**(7), 4939–4944.

Maurer M, Lopez Kostka S, Siebenhaar F, Moelle K, Metz M, Knop J, Stebut E (2006). Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania* major infections . Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania* major infections . *FASEB J.*, **20**(14), 2460–2467.

McLachlan JB, Hart JP, Pizzo S V., Shelburne CP, Staats HF, Gunn MD, Abraham SN (2003). Mast cell-derived tumor necrosis factor induces hypertrophy of draining lymph nodes during infection. Mast cell-derived tumor

necrosis factor induces hypertrophy of draining lymph nodes during infection. *Nat. Immunol.*, **4**(12), 1199–1205.

Morshed M, Hlushchuk R, Simon D, Walls AF, Obata-Ninomiya K, Karasuyama H, Djonov V, Eggel A, Kaufmann T, Simon H-U, Yousefi S (2014). NADPH Oxidase–Independent Formation of Extracellular DNA Traps by Basophils. NADPH Oxidase–Independent Formation of Extracellular DNA Traps by Basophils. *J. Immunol.*, **192**(11), 5314–5323.

Nelissen S, Lemmens E, Geurts N, Kramer P, Maurer M, Hendriks J, Hendrix S (2013). The role of mast cells in neuroinflammation. The role of mast cells in neuroinflammation. *Acta Neuropathol.*, **125**(5), 637–650.

Nieto-Patlán A, Campillo-Navarro M, Rodríguez-Cortés O, Muñoz-Cruz S, Wong-Baeza I, Estrada-Parra S, Estrada-García I, Serafín-López J, Chacón-Salinas R (2015). Recognition of *Candida albicans* by Dectin-1 induces mast cell activation. Recognition of *Candida albicans* by Dectin-1 induces mast cell activation. *Immunobiology*, **220**(9), 1093–1100.

O’Riordan M (2002). The host cytosol: front-line or home front? The host cytosol: front-line or home front? *Trends Microbiol.*, **10**(8), 361–364.

Özyildiz Z, Dinçel GÇ, Terzi OS, Özsoy ŞY, Kul O (2018). Immunohistochemical investigation of the damage to and repair of myelin, and astrocyte activity in small ruminants resulting from with natural meningoencephalitic listeriosis. Immunohistochemical investigation of the damage to and repair of myelin, and astrocyte activity in small ruminants resulting from with natural meningoencephalitic listeriosis. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, **65**(3), 283–290.

Porzionato A, Macchi V, Parenti A, De Caro R (2004). The distribution of mast cells in the human area postrema. The distribution of mast cells in the human area postrema. *J. Anat.*, **204**(2), 141–147.

Quinn P, Markey K, Carter E, Donnelly C, Leonard C, Maguire D (2002). *Veterinary Microbiology and Microbial Diseases*. USA: Blackwell Science.

Radostits O, Gay C, Hinchcliff W, Constable D (2007). *Veterinary Medicine: A Text Book of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*. USA: Elsevier Health Science.

Ramos-Kichik V, Mondragón-Flores R, Mondragón-Castelán M, Gonzalez-Pozos S, Muñiz-Hernandez S, Rojas-Espinosa O, Chacón-Salinas R, Estrada-Parra S, Estrada-García I (2009). Neutrophil extracellular traps are induced by Mycobacterium tuberculosis. Neutrophil extracellular traps are induced by Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis*, **89**(1), 29–37.

Scanlan M (1988). *Introduction to Veterinary Bacteriology*. USA: Iowa State University Press.

Scheb-Wetzel M, Rohde M, Bravo A, Goldmann O (2014). New insights into the antimicrobial effect of mast cells against *Enterococcus faecalis*. New insights into the antimicrobial effect of mast cells against *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.*, **82**(11), 4496–4507.

Schnupf P, Portnoy DA (2007). Listeriolysin O: a phagosome-specific lysin. Listeriolysin O: a phagosome-specific lysin. *Microb. Infect.*, **9**(10), 1176–1187.

Senay TE, Ferrell JL, Garrett FG, Albrecht TM, Cho J, Alexander KL, Myers-Morales T, Grothaus OF, D’Orazio SEF (2020). Neurotropic Lineage III Strains of *Listeria monocytogenes* Disseminate to the Brain without Reaching High Titer in the Blood . Neurotropic Lineage III Strains of *Listeria monocytogenes* Disseminate to the Brain without Reaching High Titer in the Blood . *mSphere*, **5**(5).

Siebenhaar F, Syska W, Weller K, Magerl M, Zuberbier T, Metz M, Maurer M (2007). Control of *Pseudomonas aeruginosa* skin infections in mice is mast cell-dependent. Control of *Pseudomonas aeruginosa* skin infections in mice is mast cell-dependent. *Am. J. Pathol.*, **170**(6), 1910–1916.

Silver R, Silverman AJ, Vitković L, Lederhendler II (1996). Mast cells in the brain: Evidence and functional significance. Mast cells in the brain: Evidence

and functional significance. *Trends Neurosci.*, **19**(1), 25–31.

Silverman AJ, Sutherland AK, Wilhelm M, Silver R (2000). Mast cells migrate from blood to brain. Mast cells migrate from blood to brain. *J. Neurosci.*, **20**(1), 401–408.

Songer J, Post K (2005). *Veterinary Microbiology: Bacterial and Fungal Agents of Animal Diseases*. USA: Elsevier Health Science.

Tilney LG, Portnoy DA (1989). Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.*, **109**(4 Pt 1), 1597–1608.

Wagner M, Melzner D, Bagò Z, Winter P, Egerbacher M, Schilcher F, Zangana A, Schoder D (2005). Outbreak of clinical listeriosis in sheep: Evaluation from possible contamination routes from feed to raw produce and humans. Outbreak of clinical listeriosis in sheep: Evaluation from possible contamination routes from feed to raw produce and humans. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, **52**(6), 278–283.

Wei OL, Hilliard A, Kalman D, Sherman M (2005). Mast cells limit systemic bacterial dissemination but not colitis in response to *Citrobacter rodentium*. Mast cells limit systemic bacterial dissemination but not colitis in response to *Citrobacter rodentium*. *Infect. Immun.*, **73**(4), 1978–1985.

Wollert T, Pasche B, Rochon M, Deppenmeier S, van den Heuvel J, Gruber ADD, Heinz DW, Lengeling A, Schubert WD (2007). Extending the Host Range of *Listeria monocytogenes* by Rational Protein Design. Extending the Host Range of *Listeria monocytogenes* by Rational Protein Design. *Cell*, **129**(5), 891–902.

Wood J (1992). Encephalitic listeriosis in a herd of goats. Encephalitic listeriosis in a herd of goats. *Adv. Biol. Res.*, **1**(3–4), 118–121.

Woodbury RG, Miller HRP, Huntley JF, Newlands GFJ, Palliser AC, Wakelin

D (1984). Mucosal mast cells are functionally active during spontaneous expulsion of intestinal nematode infections in rat. Mucosal mast cells are functionally active during spontaneous expulsion of intestinal nematode infections in rat. *Nature*, **312**(5993), 450–452.

Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, Schmid I, Straumann A, Reichenbach J, Gleich GJ, Hans-Uwe S (2008). Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat. Med.*, **14**(9), 949–953.

Zachary J (Ed.) (2017). Mechanisms of Microbial Infections. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. St. Louis, Missouri: Elsevier, pp. 186–189

Zhang Y, Ramos BF, Jakschik BA (1992). Neutrophil recruitment by tumor necrosis factor from mast cells in immune complex peritonitis. Neutrophil recruitment by tumor necrosis factor from mast cells in immune complex peritonitis. *Science*, **258**(5090), 1957–1959.

Zhang Z guo, Lü T sheng, Yuan H ying (2011). Neuroprotective effects of ultra-low-molecular-weight heparin in vitro and vivo models of ischemic injury. Neuroprotective effects of ultra-low-molecular-weight heparin in vitro and vivo models of ischemic injury. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **25**(3), 300–303.