

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ATTENÜE PARAPOXVİRUS OVİS'İN KOYUNLARDA BAZI
SERUM SİTOKİN VE ANTİKOR SEVİYELERİNE ETKİSİ**

KAMİL ATLI

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof.Dr. ATILLA ŞİMŞEK

KONYA -2017

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ATTENÜE PARAPOXVİRUS OVİS'İN KOYUNLARDA BAZI
SERUM SİTOKİN VE ANTİKOR SEVİYELERİNE ETKİSİ**

KAMİL ATLI

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof.Dr. ATILLA ŞİMŞEK

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 14102034 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA -2017

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Kamil ATLI tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Veterinerlik Viroloji Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: "Prof.Dr.Sibel YAVRU"
Selçuk Üniversitesi

İmza

Danışman: "Prof.Dr.Atilla ŞİMŞEK"
Selçuk Üniversitesi

İmza

Üye: "Prof.Dr.U.Sait UÇAN"
Selçuk Üniversitesi

İmza

Üye: "Prof.Dr.Mehmet KALE"
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

İmza

Üye: "Doç.Dr.Bahadır FEYZİĞLU"
Necmettin Erbakan Üniversitesi

İmza

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Ender ERDOĞAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Tüm dünyada *Parapoxvirus ovis* tarafından meydana getirilen contagious ecthyma enfeksiyonları ile mücadelede sahadan izole edilen suşlardan hazırlanan aşılarda kullanılması yanında suşların hücre kültürlerinde attenüe edilmeleri sonucu hazırlanan canlı aşılarda tercih edilmektedir. Ancak tüm bu aşılarda konakçı immün cevabının gelişmesi üzerine etkinlikleri konusunda birçok sorunlarla karşılaşıldığı ve koruyucu özelliklerinin tam olarak şekillenmediği yönünde bilgiler mevcuttur. Aşı suşlarının bu şekilde zayıf immünolojik bir özellik sergilemelerinin aksine virusun birçok farklı hayvan türünde immünolojik ve immünopatolojik reaksiyonları istenilen etkinlik düzeyine getiren “immünomodülatör” özelliğe sahip olduğunun ileri sürülmesi birbirine zıt bir durum gibi görünmektedir. Bu araştırma ile *Parapoxvirus ovis* immünoloji ve immünopatolojisinde anlaşılamayan bazı noktaların açığa çıkarılabilmesi adına attenue edilmiş aşı suşunun, koyunlarda serum antikor ve bazı sitokin seviyeleri üzerine etkisinin belirlenmesi hedeflendi.

Akademisyenlik hayatımın en güzel, en acemi, sabırlı ve kısmen zor günlerini içinde barındıran asistanlık eğitimimin sonuna gelmiş bulunmaktayım. Her zaman mesleğimizin çekirdekten yetişme tabirini kulaklarımda işitmişimdir. Aynı zamanda akademik duruşun ve terbiyenin asla vazgeçilmez olduğunu iliklerime kadar hissettiğimi söyleyebilirim. Bir filizi yetiştirip ağaç yapmanın ne kadar zor olduğunu bir kere daha anlamış bulunmaktayım.

Her akademisyenin doktora eğitimi esnasında zorlandığı aşamalar olduğunu duymuşumdur. Ama insanın başına gelince daha iyi anladığımı söyleyebilirim. Defalarca yaşanan gel gitlerden sonra asla vazgeçmeme duygusunun ağır basmasının ne kadar gerekli olduğu aşikardır. Bu duygu sayesinde yaşanan mutluluğu tarif etmek imkansızdır.

Doktora eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, öğrencisi olmaktan mutluluk duyduğum aynı zamanda tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabrından dolayı çok kıymetli danışman hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Atilla ŞİMŞEK’e,

Engin bilgilerini hiç usanmadan bize aktaran ve mesleki etik duruşumuzun nasıl olması gerektiğini bizlere anlatan çok değerli hocam sayın Prof. Dr. Sibel YAVRU'ya, yurt dışı görevinden dolayı birlikte fazla zaman geçiremesek de varlığı ile bizlere hep mutluluk veren değerli hocam sayın Prof. Dr. Orhan YAPICI'ya, bizlere her zaman güler yüzlü yaklaşımı olan ve kıymetli bilgilerini aktaran değerli hocam sayın Prof. Dr. Oya BULUT'a, hem iş hem de özel hayatımda arkamda her zaman varlığını hissettiğim ve bu yolun zorluklarını bizlere anlatan abim, naif hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Oğuzhan AVCI'ya, doktora eğitimimiz boyunca aynı anları paylaştığım ve aynı zamanda hücre kültürü hocam sayın Arş. Gör. Irmak DİK ve kıymetli eşi Arş. Gör. Dr. Burak DİK'e,

Geldiğim günden beri her zaman isimlerini andığım ve asistanlık hayatımın ilk yıllarında bana Viroloji Kürsüsü hakkında ilk bilgileri veren değerli hocalarım, Prof. Dr. Mehmet KALE'ye, Prof. Dr. Yakup YILDIRIM'a, Yrd. Doç. Dr. Sibel HASIRCIOĞLU'na ve arkadaşım Arş. Gör. Hasbi Sait SALTİK'a,

Bu tezin yazılmasında emeği geçen hocalarım Prof. Dr. Osman ERGANİŞ'e, Prof. Dr. U. Sait UÇAN'a ve istatistik verilerinin hesaplamasında yardımını esirgemeyen çok değerli hocam Prof. Dr. Enver YAZAR'a ve Arş. Gör. Gonca SÖNMEZ'e DOLLVET Veteriner Aşı, İlaç ve Biyolojik Madde Üretimi San. ve Tic. A.Ş. bünyesinde çalışan değerli meslek büyüğüm Dr. Nilay ÜNAL'a ve Zeliha ARSLAN'a, çalışmada kullandığımız koyunların tedarik edilmesinde yardımcı olan Veteriner Hekim Mustafa ERKEK ve Cumhuriyet ADIY'ya, uzun süren numune alımında sabırlı duruşuyla Yusuf ve Zeki ÖZTÜRK'e,

Bu zorlu eğitimim boyunca bana olan desteği ve inancını hiçbir zaman kaybetmeyen ve her zaman yanımda olduğu için ona müteşekkik olduğum çok kıymetli eşim Zeynep ZİYAN ATLI'ya ve çok değerli ailesine ve beni buralara kadar yetiştiren kıymetli aileme teşekkürlerimi ve saygılarımı iletmek isterim.

Bu tezin yapılmasını destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP)'ne ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli çalışanlarına yaptıkları katkılardan dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR

vi

1. GİRİŞ

1

1. 1. Genel Bilgiler

1

1.2. Etiyoloji

3

1.2.1. Virus yapısı

4

1.3. Epidemiyoloji

6

1.4. Klinik

7

1.5. Patogenez

7

1.6. Teşhis

9

1.7. Sitokinlerin Genel Özellikleri

10

1.7.1. İnterleukin-1

11

1.7.2. İnterleukin-4

12

1.7.3. İnterleukin-10

13

1.7.4. İnterleukin-12

14

1.7.5. Tümör Nekrozis Faktör

14

1.7.6. İnterferon- γ

15

1.8. *Parapoxvirus* 'lara Karşı İmmun Yanıt

16

1.9. Virulans Faktörleri (IL-10)

21

1.10. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

22

1.11. *Parapoxvirus* 'lar ve İmmun Sistemden Kaçış Mekanizmaları

23

1.12. *Parapoxvirus ovis* ile İmmünmodülasyon

25

1.13. İmmunoterapide *Parapoxvirus* 'lar

27

2. GEREÇ VE YÖNTEM

28

2.1. Araştırmada Kullanılan Hayvanlar

28

2.2. Serum Örnekleri

28

2.3. Hücre Kültürü ve Virus

29

2.4. Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

29

2.5. *Parapoxvirus ovis* 'in Üretilmesi ve Titresinin Saptanması

29

2.6. Deneysel Düzenek

30

2.7. Serum Nötralizasyon Testi

32

iv

2.8. Sitokin Seviyelerinin Ölçülmesi	33
2.9. İstatistik Analizi	34
3. BULGULAR	35
3.1. Virusun Titresi	35
3.2. Serum Nötralizasyon Testi Sonuçları	37
3.3. Serum Örneklerinde Sitokinlerin ELISA sonuçları	37
3.4. Sitokin ELISA Sonuçlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	38
4. TARTIŞMA	46
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	54
6. KAYNAKLAR	55
7. EKLER	61
Ek. A: Etik Kurul Kararı Örneği	61
8. ÖZGEÇMİŞ	62

SİMGELER VE KISALTMALAR

AGID	Agar Gel İmmünodifüzyon
APC	Antijen Presenting Cells
BCGF-1	B hücre büyüme faktörü-1
BMDC	Fare kemik iliği dendritik hücreleri
BPSV	Bovine papular stomatitis virus
BSF-1	B hücre uyarıcı faktör-1
°C	Derece Santigrad
CBP	CREB bağlayıcı protein
CD1	Cluster of differentiation 1 (başkalaşım kümesi 1)
CD4+	Yardımcı T hücreleri
CD8+	Sitotoksik T hücreleri
CD95	Tümör baskılayıcı gen
CMV	Cytomegalovirus
CO₂	Karbondioksit
Con A	Concanavalin A
CPE	Sitopatik etki
DC	Dendritik Hücre
dk	Dakika
DKID₅₀	Doku Kültürü İnfeksiyöz Doz
DMEM	Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium
DNA	Deoksi ribonükleik asit
dsDNA	Çift iplikçikli deoksi ribonükleik asit
EBV	Epstein-Barr virusu
ELAM-I	Endothelial-leucocyte adhesion molecule- I
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EM	Elektronmikroskop
FAS	Transmembran protein (Apoptozis)
FDS	Fötal Dana Serum
G+C	Guanin+Sitozin
GIF	GM-CSF-inhibitory factor
GM-CSF	Granülosit makrofaj-koloni stimulan faktör
GVH	Graft-versus-hastalığı

HBV	Hepatit B Virusu
HLA	Human leukocyte antigen
HRP	Horse Radish Peroxidase
HSV	Herpes Simplex Virus
ICAM-I	Intercellular adhesion molecules
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IFA	İmmunfloresan antikor testi
IFN-α	İnterferon-alfa
IFN-β	İnterferon-beta
IFN-γ	İnterferon-gama
IgA	İmmunglobulin A
IgE	İmmunglobulin E
IgG	İmmunglobulin G
IgM	İmmunglobulin M
IL-1α	İnterleukin 1 alfa
IL-1β	İnterleukin 1 beta
IL-1RA	İnterleukin 1 reseptör antagonisti
IL-2	İnterleukin 2
IL-3	İnterleukin 3
IL-4	İnterleukin 4
IL-5	İnterleukin 5
IL-6	İnterleukin 6
IL-8	İnterleukin 8
IL-9	İnterleukin 9
IL-10	İnterleukin 10
IL-11	İnterleukin 11
IL-12	İnterleukin 12
IL-13	İnterleukin 13
kDa	kilo Dalton
LAK	Lymphokine-activated killer cell
LPS	Liposakkarit
LT-beta	Lenfotoksin beta
M-CSF	Makrofaj-koloni stimulan faktör

MDBK	Madin Darby Bovine Kidney
MHC	Major histocompatibility complex
µl	Mikrolitre
mL	mililitre
mRNA	messenger RNA
ng/L	nanogram/Litre
NK	Natural killer
nm	nanometre
NP-40	Nonyl phenoxypolyethoxylethanol deterjanı
NT	Nötralizasyon Testi
OD	Optical Dansite
ORFV	Orf Virus
PBS	Phosphate-buffered saline
PCPV	Pseudocowpox virus
PCR	Polymerase chain reaction
pg/mL	pikogram/mililitre
pH	Power of Hydrogen
PIGF	Plasenta büyüme faktörü
PMA	Perfüze merkezi arter
PVNZ	Parapox Virus New Zealand
qPCR	quantitative (kantitatif) PCR
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	Revolutions per minute
STD	Standart
sTNFR	TNF reseptörlerinin çözünebilen formları
TGF	Transforming Growth Factor
TGF beta	Transforming Growth Factor Beta
Th1	Yardımcı T hücresi 1
Th2	Yardımcı T hücresi 2
TNF	Tumour Necrosis Factor
TNFR	Tumour Necrosis Factor Receptor
TNF-β	Tumour Necrosis Factor beta
UV	Ultraviyole

VACV	Vaccinia Virus
VEGF	Vasküler endothelial büyüme faktörü
WBC	Akyuvarlar
YLDV	Yaba-like disease virus



ÖZET

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Attenüe *Parapoxvirus Ovis*'in Koyunlarda Bazı Serum Sitokin ve Antikor Seviyelerine Etkisi

Kamil ATLI

Veterinerlik Viroloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ/KONYA- 2017

Parapoxvirus ovis (ORFV) enfeksiyonları küçük ruminantların önemli bulaşıcı viral hastalıklarından birisidir. Ülkemizde ve tüm dünyada bu hastalığa karşı çeşitli aşılar kullanılmaktadır. Bu araştırma ile attenüe orf virus aşısı uygulanan koyunların kan serumlarında nötralizan antikor varlığı ile sitokin miktarlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada ORFV'ye karşı antikora sahip olmayan, herhangi bir etkene karşı aşı uygulaması yapılmamış ve 6-8 aylık 10 adet Akkaraman erkek toklu kullanıldı. Hayvanların inguinal bölgelerinin kılız kısımlarına attenüe ORFV'nin 0,5 ml'si ile skarifikasyon işlemi yapıldı. Aşılamadan önce 0. saat (kontrol) ve sonraki 6., 12., 24., 48., 72., 96., 120. saat, 7., 14., 21., 30., 60., 90., 120., 150. ve 180. günlerde v.jugularisten serum örnekleri alındı. Elde edilen serumlarda nötralizan antikor varlığı araştırıldı. Buna ilave olarak toplanan serum örneklerinde proinflamatuvar özelliğe sahip (Th1) sitokinlerden IL-1 β , IL-12, IFN- γ , TNF- α , anti inflamatuvar özelliğe sahip (Th2) sitokinlerden IL-4, ve IL-10 düzeyleri ELISA yöntemi kullanılarak belirlendi.

Attenüe ORFV uygulaması sonucu elde edilen tüm serum örneklerinde nötralizan antikor tespit edilemedi. IL-1 β , IL-12, IFN γ , TNF- α ve IL-10 seviyelerinde kontrol serumlarına göre istatistiki açıdan önemli bir fark meydana gelmediği ($p>0,05$) görülmekle beraber, IL-4 düzeyinde 30. günde istatistiki açıdan bir artış tespit edildi ($p<0,05$).

Araştırma sonucunda attenüe canlı ORFV uygulamasının nötralizan antikor ve IL-4 hariç serum sitokin düzeylerinde bir değişime neden olmadığı belirlendi. İleride kullanılacak aşının immün sistem üzerine etkilerinin net olarak ortaya konulduktan sonra kullanılması gerektiği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: attenüe suş; koyun; ORFV; sitokin.

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Effect Of Attenuated Parapoxvirus Ovis on Levels of Some Serum Cytokine and Antibody in Sheep

Kamil ATLI

Department of Veterinary Virology

PhD THESIS / KONYA-2017

Parapoxvirus ovis (ORFV) infection is one of important contagious viral diseases of small ruminants. Various vaccines are used against this disease in our country and all over the world. The aim of this study was to determine the concentration of cytokine and neutralizing antibody in blood serum of sheep that were administered attenuated orf virus vaccine strain.

In this study, 10 male Akkaraman sheep, 6-8 months of age, tested negative for ORFV antibodies and not vaccinated against any agent were used. Scarification was applied with 0.5 ml of attenuated ORFV at hairless parts of inguinal region of each animal. Serum samples were obtained from v. jugularis at 0. hour (control) before the inoculation and at the following 6.,12.,24.,48.,72.,96.,120. hours, 7.,14.,21.,30.,60.,90.,120.,150. and 180. days. Antibody presence was investigated in the sera by serum neutralizing test. In addition, levels of IL-1 β , IL-12, IFN- γ , TNF- α from proinflammatory cytokines (Th1) and IL-4 and IL-10 from anti-inflammatory cytokines (Th2) were determined by ELISA.

Neutralizing antibody could not be detected in all serum samples. ORFV caused fluctuations but no statistically significant change in levels of IL-1 β , IL-12, IFN γ , TNF- α and IL-10 were detected ($p>0,05$), and significant increase in IL-4 level was detected 30th day compared to control sera ($p<0,05$).

As a result of the study, attenuated live ORFV administration did not stimulate neutralizing antibodies and have no effect on levels of some serum cytokine except IL-4. It was concluded that the vaccines against ORFV infection considered to be used in the future should be applied after the effects on the immune system have been clearly demonstrated.

Keywords: attenuated strain; cytokine; ORFV; sheep.

1. GİRİŞ

1. 1. Genel Bilgiler

Orf virus (ORFV)'u, contagious pustular dermatitis, scabby mouth, contagious pustular stomatitis, contagious ecthyma ya da kısaca ektima olarak bilinmekte, koyun keçi ve insanlarda zoonotik özellikte enfeksiyona neden olan *Poxviridae* familyasına ait *Parapoxvirus* alt familyasında yer almaktadır (Çabalar ve ark 1996, Fleming ve ark 1997, Housawi ve Abu Elzein 2000). ORFV yaklaşık 140-300 nm arasında olup, dairesel çift iplikçikli deoksi ribonükleik asit (dsDNA) yapısına sahiptir (Deane ve ark 2000). Isıya karşı oldukça dayanıklı olan Orf virusunun 50°C'da 30 dakika süreyle stabil kaldığı, 55°C'da 30 dakika enfeksiyözitesini tamamen kaybettiği, 60°C'da 30 dakikadan sonra enfeksiyözite gücünde kayıplar olduğu bildirilmiştir. ORFV'nin pH 3 olan ortamda çok duyarlı olduğu ve enfeksiyözite yönünden oldukça fazla etkilendiği bildirilmiştir. ORFV suşlarının oda sıcaklığında 30 dk süre ile yağ eriticilerinden eter ile muamele edildiğinde enfeksiyözite güçlerinde $10^{1.5}$ - $10^{2.5}$, aynı süre ve şartlarda kloroform ile muamele edildiğinde enfeksiyözite güçlerinde 10^4 oranında azalma meydana geldiği belirtilmiştir (Burgu ve Toker 1987).

ORFV enfeksiyonu ilk kez 1787 yılında Steeb tarafından koyunlarda tanımlanmış olup, 1879 yılında da keçilerde belirlenmiştir. 1934 yılında Newson ve Cross insanda ilk orf vakasını rapor etmiştir (Saçar ve Saçar 2012).

Hastalığın ortaya çıktığı sürülerde morbidite %100'e ulaşabilirken, mortalite ise %1 civarındadır. Ancak süt emme dönemindeki hayvanların mortalitesi %50'ye kadar çıkabilmektedir (Gökçe ve ark 2005).

Ektima dünyada olduğu gibi ülkemizde de yaygın olarak gözlenmektedir. Özellikle 3 ile 6 aylık genç hayvanlarda daha yaygın gözlenirken, çok az oranda erişkin hayvanlar da etkilenmektedir. Özellikle besi kuzularında, sürüye katılımlarla sürünün büyütülmesi durumunda enfeksiyon riski bir hayli artmaktadır. ORFV'nin inkubasyon süresi 3 ile 10 gün arasında değişmektedir. Hastalık klinik olarak labial, podal ve genital olarak seyretmektedir. Türkiye'de hayvanlarda ORFV'nin neden olduğu enfeksiyonun üzerine yapılan ilk çalışma 1960 yılında Böğrün ve arkadaşları

tarafından enfekte kuzulardan alınan kabuklarla aşı hazırlanması şeklinde gerçekleştirilmiştir (Çabalar ve ark 1996).

Poxviridae ailesi enfekte konakçı immün yanıtının üstesinden gelebilmesi için genomlarında çeşitli virulans faktörleri kodlamaktadırlar. Bazı vakalarda bu virulans faktörlerinin konakçı immün proteinleriyle homolog yapıya sahip oldukları ve bu süreçte *poxvirus*'ların konakçı genlerini ele geçirdikleri düşünülmektedir. Bu faktörlere, tümör nekrosis faktör (TNF), interleukin 1(IL-1), interferon gama (IFN- γ) ve interferon alfa (IFN- α) ile beta (IFN- β) reseptörlerinin yapısına benzerlik gösteren *poxvirus* proteinleri örnek gösterilebilir. Buna ilaveten *poxvirus*'lar, konakçı büyüme faktörünün homoloğu olan molekülü ve apoptosiste sinyal iletimini inhibe eden faktörleri kodlamaktadırlar. ORFV'ye karşı Th1 (yardımcı T hücresi 1) tipi immün yanıt gelişmesi sonucu, konakçı enfeksiyona yeniden yatkın hale gelmektedir. Bu yüzden paranteral olarak uygulanan klasik aşılar bu hastalıkta etkisiz kalmaktadır. Zayıflatılmış aşılar ile orf virus enfeksiyonunun şiddeti sınırlandırılabilir, fakat hastalığı tamamen önlemek mümkün değildir (Fleming ve ark 1997, Saçar ve Saçar 2012).

İmmün sistem ile ORFV'nin arasındaki etkileşim yıllar boyunca araştırma konusu olmuştur (Weber ve ark 2003). Orf virus enfeksiyonunu takiben, ilk olarak organizmaya giren patojen etkenleri elemine etmek için programlanmış olan konakçı immün sistemi tarafından virusa karşı doğal immün bir yanıt başlatılır (Fleming ve Mercer 2007). Bu durum doğal immün sistemin çeşitli hücreleri tarafından kemokin ve sitokin salınımının uyarılması ile sonuçlanır. ORFV enfeksiyonu, enfeksiyon bölgesinde natural killer (NK) hücreleri, nötrofiller ve dendrik hücrelerin birikimine yol açmaktadır. Buna ek olarak ORFV IFN- α , interleukin-1 β (IL-1 β), IL-8, granülosit makrofaj-koloni stimulan faktör (GM-CSF) ve IFN- γ salınmasına neden olmaktadır (Haig ve McInnes 2002).

ORFV'nin immünoaktivatör proteinleri de içine alan immün sistemi düzenleyen birçok faktörü kodlamaktadır. ORFV'nin immün sistemi düzenleyici özellikleri, veteriner hekimlik alanındaki araştırmalarda önemli ilgi odağı olmuş ve "paramünite aktivatörü" tanımının yerleşmesine neden olmuştur. Bu immün sistemi düzenleyen ilaçlar, inaktif edilmiş tam ORFV içermekte olup birçok araştırma ve türde çalışılmıştır. Bütün bu çalışmaların sonucu olarak, birçok kompleks olayın bir

arada rol oynadığı in vivo ortamlarda attenué edilmiş ORFV'nin hedef tür olan koyunlarda ya da diğer hayvan türlerinde immün yanıt mekanizmasını nasıl etkilediğini ayrıntılı olarak ortaya koyacak araştırmaların yapılması gerektiği vurgulanmaktadır.

1.2. Etiyoloji

Bulaşıcı pustuler dermatit veya ORFV ilk kez 1787'de tanımlanmıştır. Ancak çobanlar, hastalığı yıllarca koyunların uyuz hastalığı olarak kabul etmişlerdir. Ancak, 1800'li yılların sonlarında ORFV'nin bulaşıcı özelliğe sahip olduğu kabul edilmiş ve insanların enfeksiyona olan yatkınlığı bildirilmiştir. 1923 yılında, çoğu bakteriden daha küçük olan ve "filtre edilebilir" viruslar grubuna dahil edilebilen bir etken ile hastalığın koyunlar arasında bulaşabileceği bildirilmiştir. Daha sonra etkenin suşlar arasında çapraz korunmanın olmadığı belirlenen ORFV'nin meydana getirdiği doğal enfeksiyonlar sahada tanımlanmış olup virusun histolojik görünümüne, çözücülere ve kimyasallara duyarlılığına, bağışıklığının gelişimi ve süresine, serumun pasif transferi ile meydana gelecek korunmanın yetersiz olduğuna ve attenué edilmemiş canlı ORFV'den hazırlanan aşılarda geliştirilmesine yönelik bir süreç günümüze kadar süregelmiştir. Günümüzde ORFV'e karşı hazırlanmış attenué aşı bulunmaktadır ve hücre kültürlerinde üretilen aşı yaygın bir biçimde kullanılmaktadır (Fleming ve Mercer 2007).

Sahadan elde edilen örneklerde *Parapoxvirus ovis*'in in vitro sistemlerde üretilmesinin güç olduğu ileri sürülmekle beraber laboratuvar suşlarının primer insan amnion hücre kültürleri ile koyun, keçi, sığır orijinli hücre kültürlerine adapte edilerek üretilbildiği belirtilmiştir. *Parapoxvirus ovis*'in, primer kuzu böbrek hücre kültürü, civciv ve ördek embriyosu fibroblast hücre kültürlerinde üretildiği bunun yanında koyun tiroid, dana böbrek ve maymun hücre kültürlerinde de ürediği ispatlanmıştır (Burgu ve Toker 1984, Gökçe ve ark 2005).

Parapoxvirus ovis'lerin sınıflandırılması oldukça uzun sürede gerçekleştirilmiş ve kullanılan terminolojide çok sayıda karışıklık olmuştur. Şu anda *parapoxvirus ovis* olarak adlandırılan *Chordopoxvirus* alt familya üyelerine ait genuslar, uzun süredir poxvirus benzeri hastalıklara neden olduğu kabul edilmesine rağmen 1956 yılına kadar poxvirus sınıfında yer almamıştır (Downie ve Dumbell

1956). Günümüzde *Chordopoxvirus* genusuna ait az sayıda üye bulunmaktadır, bunların başlıcaları koyun ve keçilerin pustular dermatitisi (Orf virus), bovine papüler stomatitis ve pseudocowpox virusudur. Günümüzde *parapoxvirus ovis*'in International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) tarafından sınıflandırılması; ORFV (bulaşıcı pustular dermatit virus ve bulaşıcı ektima virus), Bovine papular stomatitis (BPSV) (bovine papular (pustular) stomatitis virus), *Pseudocowpox virus* (PCPV, sütçü nodülü virusu, paravaccinia virus) ve yeni ilave edilen Yeni Zelanda kırmızı geyiklerdeki *parapoxvirus* olarak son hale getirilmiştir. *Parapoxvirus* genusu içinde kesin olmayan fok balığı parapoxvirusu, develerin *parapoxvirus* 'u (develerin bulaşıcı ektiması ya da Ausdyk disease) ve dağ keçilerinin bulaşıcı ektima virusu gibi türler bulunmaktadır. Kırmızı sincaplarda ölümcül hastalığa neden olan bir *poxvirus*, virion morfolojisine bakılarak, başlangıçta büyük olasılıkla *parapoxvirus* olduğu düşünülmüştür. DNA sekans bilgilerine göre, bu virusun bir *parapoxvirus* olmadığı ve sınıflandırılmamış bir *poxvirus* olduğuna işaret edilmektedir (Thomas ve ark 2003).

1.2.1. Virus yapısı

Parapoxvirus ovis'in virion yapısı, karakteristik bir ovoid yapıya sahiptir ve bu morfoloji, *poxvirus* ailesinde ayrı bir grup olarak yer almalarının temelini oluşturmuştur. ORFV'nin elektron mikroskop görüntüsü, uzun eksenini yaklaşık 260 nm ve kısa eksenini 160 nm büyüklüğündedir (Nagington ve Horne 1962, Nagington ve ark 1964, Peters ve ark 1964). *Parapoxvirus*'ların negatif boyanmış preparatları iki şekilde görünür. Boyanın virion içerisine girdiği kapsüler formda, içte yer alan çekirdeği saran ince bir membran görünmekte, boyalara karşı dayanıklı olan virionlar partikül uzunluğu boyunca çapraz şekilde düzenlenmiş düzenli bir dizi tubül benzeri yapı ortaya çıkmaktadır (Mitchener 1969, Hiramatsu ve ark 1999). Virus hücre kültüründe çoğaltıldığı zaman, ortamda görülen virionlar 9-18 nm kalınlığında membranöz bir yapı ile çevrilir. Bu membran *Vaccinia Virus* (VACV)'ye benzetilerek golgiden türetildiği ileri sürülmüştür. Elektron mikroskobu ile görülen çapraz çizgi şeklindeki yapılar, viral partiküllerin yün yumağı gibi spiral şeklinde tubül benzeri yapıların üst üste sarılmış şekilde görünmesine neden olmaktadır. ORFV'nin yüzey yapısı, virion yüzeyinde spiral biçimde sıralanmış çıkıntıların görülebildiği ultra yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskop kullanılarak

tanımlanmıştır (Hiramatsu ve ark 1999). *Parapoxvirus ovis*'lerin virion partiküllerini oluşturan polipeptidleri karakterize etmek için çok az çalışma yapılmıştır. ORFV virion polipeptidlerinin ilk karakterizasyonu poliakrilamid jel elektroforez ile gerçekleştirilmiş olup 35 polipeptit görüntülenmiştir. (Ballasu ve Robinson 1987). NP-40 ve 2-mercaptoethanol ile işlenerek çözündürülmüş ORFV virion polipeptitlerinin analizi, boş virion preparatlarında ayırt edilebilen 35 polipeptid bandının 13'ünün, deterjan ile işlem gördükten sonra süpernatant kısımlarında bulunduğu tespit edilmiştir. 38.5 kDa'lık bir polipeptit için önemli oranda bir bant oluşumu olduğu görülmüştür. Diğer 12 polipeptid için kuvvetlenme dereceleri değişmekle beraber virus preparatlarındaki gözlenen ana bantın 64.5 kDa büyüklüğe sahip önemli bir çekirdek polipeptidi olduğu düşünülmüştür. Bazı araştırmacılar ORFV'nin yaklaşık 30-40 yapısal proteinini tespit ettiklerini bildirmişlerdir (Rosenbusch ve Reed 1983, Buddle ve ark 1984, McKeever ve ark 1987). PCPV üzerine yapılan araştırmalar, 40'a kadar polipeptidin SDS-PAGE ile çözülebildiğini göstermiştir (Thomas ve ark 1980).

ORFV partiküllerine karşı üretilen monoklonal antikorlar, virion yapısını oluşturan proteinlerin tanımlanmasına yardımcı olmuştur. Bu antikorların çoğunluğu 65, 39 veya 22 kDa'lık proteinlerle reaksiyona girmiştir (Czerny ve ark 1997, Housawi ve ark 1998). İmmünodominant 39 kDa proteinini kodlayan gen, VACV geni H3L geninin bir homologudur (Housawi ve ark 1998, Scagliarini ve ark 2002). VACV H3L geni, C-terminal demir proteinlerinin bir üyesi olan ve virusun olgunlaşmasında (da Fonseca ve ark 2000b) ve memeli hücrelerine hücre içi adsorpsiyonunda rol oynayan 35 kDa'lık (da Fonseca ve ark 2000) immünodominant bir virion membranı proteinini kodlamaktadır (Zinoviev ve ark 1994 Lin ve ark 2000). Yaklaşık 40 kDa'lık bir polipeptidin yüzey tubülünün ana bileşeni olduğuna dair güçlü kanıtlar vardır (Thomas ve ark 1980, Ballasu ve Robinson 1987, McKeever ve ark 1987, Yirrel ve ark 1994).

Parapoxvirus'lar elektron mikroskop ile görüntülendiğinde spesifik virion morfolojisine ve genomunda yoğun miktarda G+C içeriğine sahiptir ve konak dağılımı oldukça geniştir. Bununla birlikte bu ayırt edici özelliklerin her biri *Parapoxvirus* sınıfında yer almayan *Poxvirus*'larda da bulunmakta olup daha ileri

analiz yöntemleri özellikle DNA sekans analizi yeni virusların cinslere dahil olması için gereklidir (Fleming ve Mercer 2007).

1.3. Epidemiyoloji

Parapoxvirus ovis enfeksiyonlarının yayılması ve kontrolünde, sahada bulunan virionların doğal direncinin ve tekrarlayan enfeksiyonlarda oluşan kısa süreli bağışıklığın önemli olduğuna inanılmaktadır. ORFV özellikle 1 yaşından küçük hayvanları enfekte etmektedir ve özellikle 3-4 aylık ve doğumdan hemen sonra kuzuları etkilemektedir. Yaş olarak büyük hayvanlar da etkilenebilmekte ve yılın her döneminde salgınlar gözlemlenebilmektedir. Morbidite oranı % 90'ın üzerinde olup mortalite genellikle düşüktür. Hastalık koyun ve keçilerde özellikle kurak mevsimlerde kuru otlar ile beslenme döneminde yaygın şekilde görülür. Sürü içerisinde yayılımı oldukça hızlı olan hastalık enfekte hayvanlarla temas ya da dökülen kabuklar ile oluşmaktadır. Hastalığın yaşlı koyun ve keçilerde prevalansı düşüktür. Bunun nedeni hayvanların gerek hastalığı atlatmalarından gerekse aşılamalardan kaynaklanabilir. Koyun ve keçilerde memelerde görülmesinin nedeni genellikle enfekte kuzu ve oğlakların süt emmeleri esnasında ağız lezyonlarından virusu annelere bulaştırmalarından kaynaklanabilmektedir. Ayrıca enfekte olmuş hayvanlarda verim kaybı görülmektedir. Virus kronik enfekte hayvanlarda bulunabilmektedir (Ergin ve Köklü 1975, Fleming ve Mercer 2007).

Koyun ve keçiler, yabani ruminantlar, lamalar ve insanlar ORFV'ye duyarlıdır. Hastalığın bulaşması direkt temas (lezyonlu bölgenin teması ya da hayvanın salyasıyla), içme suyu veya yem ile indirekt yolla olabilir. Ayrıca virusun ahır kapılarında, çitlerde, hayvanların beslendiği alanlarda ve kırkım makaslarında bulunduğu unutulmamalıdır (Öztürk ve ark 2007). Çoğu zaman memede ağırlı lezyonların olması durumunda, süt sağımını ya da yavruyu emzirmeyi etkilemekte, enfekte olmuş hayvanlarda verim kaybı görülmekte ve salgından etkilenen çiftliklerde ekonomik kayıplara neden olmaktadır. ORFV enfeksiyonları zoonozdur. İnsanlarda zoonotik bulaşma, sağımıcılar, veteriner hekimler, çiftçiler ve kasaplar gibi risk grubu meslekler ve hayvanlar ile doğrudan temas eden kişilerde gerçekleşmektedir. Ayrıca az bir ihtimal de olsa vahşi hayvanlardan bulaşma da mevcuttur. İnsandan insana bildirilen bulaşma vakalarının daha iyi anlaşılması için kapsamlı araştırmalara önem verilmesi gerekmektedir. İnsanlardaki klinik belirtiler,

ellerde ve az oranda da yüzde ağırlı lezyonlar şeklindedir (Gameel ve ark 1995, Hosamani ve ark 2009, Oliveira ve ark 2016).

1.4. Klinik

Labial formda alt ve üst dudaklarda ve memede vezikül oluşumundan sonra kahverengi kırmızı kabuklarla örtülü sarı püstüller görülmektedir. Podal formda lezyonlar tırnağın üst kısmında, tırnak arasında ve corium coronarium'da; genital formda ise memede, bacağın iç kısmında, vulva'da, prepişyum'da şekillenmektedir. Hastalığın ilerlemesi ve iyileşmesi, nötrofillerin, T ve B hücrelerin, enfekte epidermal hücrelerin yakınındaki dendritik hücrelerin bölgeye hücum etmesi ile yaklaşık 1-2 ay içinde gerçekleşmektedir. Keratinositler başlıca çoğalma yerleri olup bu hücrelerde eozinofilik sitoplazmik inklüzyonlar ve çekirdek şekillerinde düzensizlik gözlenir. Lezyonun ilerlemesi, maküllerin ve papüllerin oluşumundan sonra veziküller ve püstüllerin meydana gelmesi şeklindedir. Komplikasyonun gelişmediği durumlarda hayvanlar 3 ila 8 hafta içerisinde hastalıktan kurtulabilmektedirler. Enfeksiyon süresinin uzaması nedeniyle sekonder olarak bakteriyel ve paraziter enfeksiyonlar gelişebilmektedir (Burgu ve Toker 1984, Çabalar ve ark 1996, Öztürk ve ark 2007).

1.5. Patogenez

Genel olarak, *Parapoxvirus ovis* enfeksiyonunun patolojisi, epitel ve oral mukoza ile sınırlıdır. Virus genellikle derideki sıyrıklarla bulaşır ve enfeksiyon yerlerinde gözlenen klinik patoloji tipik olarak pustul ve kabuk oluşumudur (Wilson ve ark 1972, Munz ve ark 1986, Horner ve ark 1987, Buttner ve Rziha 2002). *Parapoxvirus ovis*'in sistemik olarak bulaşabileceğine dair çok az kanıt bulunmaktadır. *Parapoxvirus ovis* lezyonları makül, papül, vezikül, kabuk ve iyileşme safhalarını içermektedir. Enfeksiyon virusun girdiği bölgede kızarıklık ve şişme ile başlar ve 24 saatin içinde küçük veziküller gelişir. Lezyonlar ilerledikçe pustuler bir görünüm kazanırlar. Lezyonların pustuler yapısı, granülositlerin geniş bir infiltrasyonuna neden olmaktadır. Birbirine yakın lezyonlar hastalığın ilerleyen aşamalarında kabuk oluşturarak birleşmektedir. Kabuk altında kalan dermis tabakası, lezyona granüloamatöz bir görünüm sağlayan ödematöz ve proliferatif bir hale dönüşür. Genellikle lezyonların iyileşmesi 4-6 haftayı bulmakla beraber Yeni

Zelanda'daki Doğu Fresian koyunlarında büyük tümöral yapıların geliştiği ve persiste ORFV enfeksiyonlarının gözlemlendiği görülmüştür ve bir oğlakta şiddetli, uzun süre devam eden (6 ay) bir kontagiyöz ektima enfeksiyonunun varlığı da bildirilmiştir (Abu Elzein ve Housawi 1997).

ORFV ile enfekte olmuş koyun ve keçilerde lezyonlar genellikle ağız ve ağız içi boşluğunda seyreder (Haig ve Mercer 1998). ORFV lezyonları normalde iyi huyludur, ancak bakteriler ya da mantarlar sekonder enfeksiyona neden olurlar ise ciddi komplikasyonlar ortaya çıkabilmektedir. ORFV enfeksiyonları genellikle genç kuzularda ya da beslenmesi etkilenen yavrualarda zayıflamaya neden olmaktadır (Tryland ve ark 2005).

ORFV (McKeever ve ark 1988, Jenkinson ve ark 1990a, Jenkinson ve ark 1991), PCPV (Groves ve ark 1991) ve BPSV'nin doğal ve deneysel enfeksiyonlarının histopatolojik özellikleri tanımlanmış olup birçok özellik bu üç virusun hepsinde ortaktır. *Parapoxvirus ovis* enfeksiyonları belirgin şekilde proliferatif özelliğe sahiptirler. Enfekte epidermis, stratum spinosumda keratinositlerin şişmesi ve vakuollerin oluşması, retiküler dejenerasyon, belirgin düzeydeki epidermal proliferasyon, intradermal mikroapseler ve kabuklanma ile karakterizedir. İntrasitoplazmik eozinofilik inklüzyon cisimcikleri, enfeksiyondan 72 saat sonra şişme meydana gelen keratinositlerde görülebilmektedir. Epidermal proliferasyon belirgin şekilde bağ dokunun papiller tabakasının epitel doku içerisine parmaklı uzantılar (rete peg) yapmasına yol açar. Nötrofiller, retiküler dejenerasyon alanlarına göç ederler ve sonrasında patlayan mikroapseler oluştururlar. Hiperkeratoz, proteinli sıvı, dejenere nötrofiller, hücresel döküntü ve bakterilerden oluşan kalın ölçekli kabuk tabakası oluşur. Dermal lezyonlar, ödem, belirgin kılcıl damar genişlemesi ve yangısal hücrelerin infiltrasyonunu kapsamaktadır. Psödoepitelyomatöz hiperplazi ve granüloma oluşumunda meydana gelen papillomatozis doğal ORFV enfeksiyonlarında sıklıkla gelişmektedir (Fleming ve Mercer 2007).

Parapoxvirus ovis (ORFV) suşlarının çoğu insanlara bulaşabilir. Virus genellikle enfekte olmuş hayvanlarla yakın temasta bulunan kişilerin ellerine bulaşmaktadır. ORFV lezyonları koyun endüstrisinde çalışan insanlarda nispeten yaygındır ancak son zamanlarda rapor edilen ORFV enfeksiyonlarının, kurban

bayramında koyunların çıplak el ile kesilmesi esnasında meydana geldiği bildirilmiştir (Ghislain ve ark 2001). Hayvanlarda meydana gelen lezyonların aksine, enfeksiyon odakları lokalize kalırlar. ORFV'nin neden olduğu hastalık, enfeksiyondan iyileşme dönemine kadar altı aşamada görülmüştür. Üst epidermis hücrelerinin vakuolizasyonu ile karakterize olan, makulopapular aşama (1-7 gün); makroskopik olarak makulopapular aşamadaki hücrelerin merkezinde kırmızı etrafı beyaz bir halka olan ve daha sonra yangının olduğu bölgede kırmızı bir halkanın gözlendiği hedef aşama (7-14 gün); epidermin kaybolduğu ve bazı bölgede kıl folliküllerinin genişlediği ve piknotik hücrelerin dolduğu akut aşama (14-21 gün), epitelyumun rejenere olduğu rejeneratif aşama (21-28 gün); dermis tabakasına kadar uzanan, epidermiste parmak benzeri çıkıntılara sahip, epidermal lezyon ile karakterize olan bir papilloma evresi (28-35 gün); çoğunlukla yara izi olmaksızın derinin normal kalınlığına ve görünümüne geri dönmesini sağlayan gerileyen evre (35 gün sonrası) olarak bulunmaktadır. İnsanlarda Orf enfeksiyonunun daha ciddi komplikasyonları deride yoğun miktarda damarlaşma olan tümör benzeri lezyonlar şeklinde ortaya çıkar. Bu lezyonlar, immün sistemi baskılanmış insanlarda tespit edilmekle beraber (Savage ve Blake 1972, Tan ve ark 1991) immün sistemi normal olan insanlarda da görülmüştür. ORFV enfeksiyonları eritem multiforme reaksiyonlar gibi komplikasyonlara neden olabilmekte ve bu vakalarda insanların el, bacak, ayak bileklerindeki kızarıklar kendini gösterebilmektedir (Agger ve Webster 1983, Mourtada ve ark 2000). Stevens-Johnson sendromu olarak bilinen şiddetli eritem multiforme vakaları bildirilmiş olup mukoza membranı ve deride kızarıklıklar söz konusudur. Bağışıklığı zayıf olan insanlarda şiddetli seyreden hastalık gelişebilir ve çoklu lezyon ile başvuran vakalar bildirilmiştir (Sanchez ve ark 1985). ORFV lezyonuna sahip immün yetmezliği olan insanların tedavisinde cidofovir'in başarılı bir şekilde kullanımı bildirilmiştir (Geerinck ve ark 2001). ORFV enfeksiyonuna karşı bağışıklık kısa sürmekte ve hem hayvanlar hem de insanlar tekrar enfeksiyona duyarlı olabilmektedirler (Fleming ve Mercer 2007).

1.6. Teşhis

ORFV enfeksiyonunun teşhis yöntemleri arasında temasın ne zaman olduğu ve lezyonun klinik olarak görünümü yer almaktadır. Bununla birlikte, diğer veziküler-püstüler hastalık semptomlarının benzerliği nedeniyle, ORFV

enfeksiyonlarının teşhisinde yanılgıya düşülebilir. Bu vakalarda histopatoloji ve elektronmikroskop (EM) ile kesin tanı konulmaktadır. Serolojik yöntemler olarak; Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immüno Floresan testi (IFA), agar jel immünodifüzyon testi (AGID) ve nötralizasyon testi (NT); hücre kültürlerinde virusun üretilmesi ve moleküler yöntemlerden birisi olan sınırlayıcı enzim parça uzunluğu çeşitliliği (RFLP), klasik PCR, multipleks PCR ve real-time PCR (qPCR) bulunmaktadır. ORFV enfeksiyonunun identifikasyonu ve teşhisinde mevcut yöntemler arasında moleküler yöntemler ve nükleik asit sekans analizi yaygın olarak kullanılmaktadır (Oliveira ve ark 2016).

1.7. Sitokinlerin Genel Özellikleri

Sitokinler; embriyonun gelişmesi, hematopoezis, stres, yangı, bağışıklık ve doku onarımı gibi birçok hücrel yanıt sırasında salgılanan ve hücrelerarası iletişim sinyalleri olarak rol oynayan bir grup düzenleyici proteindir. Molekül ağırlıkları 6 ile 70 kDa arasında değiştiği için heterojenite gösterirler ve çoğunlukla koruyucu karbonhidratlar ile moleküller arası disülfid bağları içerirler. Sitokinlerin çoğu, dakikada pg/mL ile ng/L konsantrasyonunda salgılanır ve sadece salgılayan hücre yakınında aktif görev yaparlar. Sitokin molekülleri dört yapısal grup içinde incelenebilir. Grup 1 sitokinler (hematopoetinler) 4 adet kümelenmiş alfa helikalinden oluşmuş yapıya sahip en büyük reseptör grubudur. İnterleukinlerin çoğu büyüme faktörleri ve interferonlar olarak bu temel yapıyı göstermektedir. Bu sitokinler çok farklı fonksiyonlara sahip olmalarına rağmen reseptörleri ortak bir beta veya gama zinciri taşır. Bu reseptörler ayrıca ortak olarak, triptofan/serin rezidüleri içermektedir. Grup 2 sitokinler, uzun zincirli bir beta kalıbına sahiptirler. Bu gruba IL-1, TNF ve Transforming Growth Factor (TGF) girer. Grup 3 sitokinler, hem alfa helikali hem de beta kalıbına sahip küçük proteinlerdir. Bu grup içinde kemokinler yer alır. Kemokinler, hücre membranına yedi kez girip çıkan tipik bir zincir yapısına sahiptir. Bu grupta IL-8 ve diğer kemokinlerin reseptörleri bulunur. Grup 4 sitokinler, farklı motiflerin bir araya geldiği mozaik yapılardır. Bu grupta IL-12 sayılabilir. Hücre membranı üzerinde bulunan reseptörlerin sadece birkaçına sitokin bağlanması bile, hücre içine sinyal iletimini başlatmak için yeterlidir. Th1 ve Th2 grubu sitokinler, CD4⁺ T-hücreleri tarafından sentezlenmektedirler. Th1 hücreleri IL-2, TNF α , IFN- γ ve lenfotoksinleri; Th2 hücreleri IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 ve

IL-13'ü sentezlerler. Bazı sitokinler hem Th1 hem de Th2 hücreleri tarafından salınır. Bunlar IL-3, TNF- α , GM-CSF'dir (Mosmann ve Sad 1996). Th1 sitokin salgılayan hücreler, hücre aracılı yangısal reaksiyonlarda görev alırken, Th2 grubu sitokin salgılayan hücreler ise daha çok antikor üretimi uyarıcısı olarak rol oynarlar (Mosmann ve Sad 1996). Sitokin ve büyüme faktörü reseptörlerinin ortak yapıları, sitokin reseptör ailesinin evriminde genetik mekanizmaların rolü olduğunu göstermektedir. Bazı insan sitokinleri fare hücrelerini veya bazı fare sitokinleri insan sitokinlerini etkiler. Bu çapraz etki, rat, tavşan, kobay, at, domuz ve köpek gibi birçok memeli için de geçerlidir. Bu durum sitokin ve sitokin reseptörlerinin bu türlerin ortak atadan ayrılmasından sonra çok az değişime uğradığını göstermektedir. Bu filogenetik ilişki daha da eskiye götürülebilir. Memeli IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFN ve TNF'sinin kanatlı versiyonları saptanmıştır. (Diker 2005, Türoğlu ve Avki 2009).

Bazı sitokinler yangıyı şiddetlendirirken (proinflamatuvar), bazıları ise sitokinlerin aktivitesini baskılamaktadır (antiinflamatuvar). IL-1 reseptör antagonisti, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11 ve IL-13 anti-inflamatuvar sitokinlerdir. IL-1 ve TNF- α ise proinflamatuvar sitokinlerdendir (Dinarello 2000).

1.7.1. İnterleukin-1

İnterleukin-1 (IL-1) iki farklı proteinden meydana gelmekte olup bunlar IL-1 α ve IL-1 β 'dir. İkinci kromozom üzerinde iki ayrı gen tarafından meydana getirilen IL-1 α ve IL-1 β 'nin antijenik yapıları farklı olmalarına rağmen biyolojik aktiviteleri ve etkinlikleri aynıdır. Monositler hem IL-1 α hem de IL-1 β üretmelerine rağmen daha çok IL-1 β üretmektedirler. Buna karşılık keratinositler daha çok IL-1 α yaparlar (Leonidas ve ark 1990).

İnterleukin-1, organizmada hemen hemen bütün hücreler tarafından üretilmekle beraber daha çok makrofajlar, keratinositler, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, dendritik hücreler, fibroblastlar ve nötrofillerde de üretilmektedir. Bazı hücrelerde IL-1 devamlı olarak yapılabilirse de mikroorganizmalar, liposakkarit (LPS), muramil dipeptid gibi maddelerle uyarıdan sonra daha fazla IL-1 yapılmaktadır. T lenfositlerini uyaran ajanlar aynı zamanda makrofajları da uyarak IL-1 oluşmasına neden olabilirler.

Makrofajların uyarılması iki şekilde olabilir.

1- Antijen sunan hücreler (APC) üzerinde bulunan ve human leukocyte antigen (HLA) sınıf II molekülü ile sunulan antijen CD4+ T hücreleri tarafından tanınır. Bu esnada makrofajlar tarafından IL-1 salgılanır.

2- Antijenle karşılaşan T hücreleri; TNF, koloni uyarıcı faktör (CSF) ve interferon- γ gibi çeşitli sitokinler salgırlar. Bunlarda makrofajları uyarak IL-1 salgılanmasına neden olabilir (Baykal ve ark 1996).

IL-1, kemik iliği hematopoetik hücrelerine etki ederek hızlı proliferatif kapasite gösteren kolonilerin oluşmasına neden olurken aynı zamanda kemik iliği stromal hücrelerine de etki ederek koloni stimüle edici faktörlerin yapılmasına neden olmaktadır. Hem IL-1, hem de TNF radyoprotektif etki göstermektedirler. IL-1 epitel hücrelerinin proliferasyonunu, tip IV kollajen ve interferon beta yapımını artırır ve bu etkisi ile de antiviral etki gösterir (Schindler ve ark 1990).

1.7.2. İnterleukin-4

İnterleukin 4 (IL-4), aktif T lenfositler ve mast hücreleri tarafından sentez edilir. B hücre büyüme faktörü-1 (BCGF-1) veya B hücre uyarıcı faktör-1(BSF-1) olarak da bilinir. 20kD ağırlığında olup kodlayan genler 5. kromozom üzerindedir. Bu bölge IL-3, IL-5, GM-CSF, M-CSF ve M-CSF reseptör genlerini de bulundurduğundan hematopoezde önemlidir. IL-4 monositleri aktive eder, klas II major histocompatibility complex (MHC), M-CSF ve GCSF oluşumunu artırır, mast hücrelerini, B ve T lenfositlerini prolifere eder, B lenfositlerde İmmünoglobulin E (IgE) sentezi ile MHC sınıf II oluşumunu uyarır ve LAK hücre oluşumuna neden olur. IL-4, B lenfositler ve monositler üzerinde IgE'nin düşük affiniteli reseptörünün (CD23) ortaya çıkmasını artırır. Makrofajların tümör hücrelerine karşı sitotoksitesini, parazitlere karşı etkinliğini, C2 proteini ve doku plazminojen aktivatör yapımı üzerine uyarıcı etkisini artırır. T lenfositler, natural killer (NK) ve LAK gibi sitotoksik hücrelerin fonksiyonel aktivitelerini ve proliferasyonunu artırır. IL-4'ün hücreler üzerinde oluşturduğu proliferasyon IL-2'ye bağımlı olmadığından siklosporin-A ile bloke edilemez. Buna karşılık NK ve LAK hücre aktivitesi IL-4 ile

bloke edilebilir. IL-4'ün bu özelliklerinden başka antikoagulan etki de oluşturduğu gösterilmiştir (Zamorano ve ark 2003).

Th2 hücreleri tarafından üretilen IL-4, anti-inflamatuar aktivite göstermektedir. Buna ek olarak monositlerin makrofajlara farklılaşmasına sebep olmaktadır, ancak makrofajların çoğalmasının baskılanmasına neden olmaktadır. IL-4, uyarılmış monosit hücrelerinden salınan sitokinlerin üretimini engellemektedir, aynı zamanda IFN- γ tarafından uyarılmış monositlerin aktivasyonunu da bozmaktadır (Opal ve DePalo 2000).

1.7.3. İnterleukin-10

Antijen sunan hücre IL-1 ile uyarılırsa Th1 hücrelerinde IL-2, INF- α , lenfotoksin ve belirli oranda B lenfosit cevabı oluşur. Th1 hücreleri geç tip hipersensitiviteyi başlatabilir. Th2 hücreleri IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, ve IL-13'ü oluşturan ve antikor yanıtı için uyarıcı rol oynayan anti-inflamatuar bir sitokindir. IL-2 hücrel immünite ve geç tip hipersensitivitede rol oynamaz. Th2 hücreler IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve B lenfositleri üzerine uyarıcı etki gösterirken, Th1 hücreleri INF- α üretimi ile Th2 hücrelerinin çoğalmasını önlemektedirler. Th2, CD8+ T, mast hücreleri, keratinositler ve B lenfositlerinde IL-10 oluştururlar. IL-10 monositler üzerindeki intersellüler adezyon molekülünün (ICAM-1) ortaya çıkmasını inhibe eder. Th2 çok güçlü immün yanıt oluşturmaları sonucunda allerjik reaksiyonlara neden olur. Çünkü Th2'den oluşan IL-4'ün IgE'ye dönüşümü, IL-5 ise eozinofillerin çoğalmasını ve farklılaşmasını artırır. IL-10 aktif mast hücreleri vasıtası ile inhibe edici etki de göstermektedir. Ayrıca, periferik ve özellikle timik T lenfositler üzerine proliferatif etki gösterir. IL-10 ve IL-4 NK vasıtası ile sitokin sentezini önlemektedir. B lenfosit farklılaşmasına neden olur ve uyarılmış B lenfositler büyük miktarda İmmünoglobulin (IgG, IgA, IgM) salgılamaktadır. Morfolojik olarak plazma hücresine benzeyen uyarılmış B lenfositleri anti-CD40'ın farklılaşmasına neden olurlar. TGF beta ile sinerjistik etki gösterir ve IgA dönüşümünde rol oynar. TGF beta bütün Ig izotiplerinin sentez ve salınımını önleyici etki göstermektedir. IL-10 T lenfosit, makrofaj sitokinlerinin sentezini önler. IFN- α lenfotoksin ve INF salınımını azaltarak antiviral aktivite de gösterir. IL-10 ve diğer Th2 sitokinleri kronik Graft-versus-hastalığı (GVH) reaksiyonunda artarlar. IL-10 hücrel immünitenin

inhibisyonunu gerektiren durumlarda tedavi amaçlı kullanılabilir. İnsan myeloma hücrelerinde IL-11'e cevabın artmasına da neden olmaktadır (Lu ve ark 1995).

IL-10, CD4+ ve CD8+ T lenfositlerde IFN- γ üretiminin baskılanması sonucunda Th2 sitokin gelişimini desteklemektedir. IL-10 hücrel immün yanıtın baskılanmasında önemli role sahiptir. IL-10, CD4+ T hücrelerin salgıladığı IFN- γ , IL-2, IL-4'ün salınımını inhibe etmektedir (Fujii ve Lotze 2007).

1.7.4. İnterleukin-12

Makrofajlar mitojenle uyarılmış veya virus ile enfekte B lenfositler, keratinositler, dendritik hücrelerden salınır ve önemli bir immünoregülatördür. IL-12 direkt olarak NK aktivasyonunu ve T lenfositlerinden INF- α üretimini uyarırken aynı zamanda bunların sitolitik aktivasyonunu da artırır. IL-2 ile uyarılmış B lenfositlerinin ve Th1 hücrelerinin maturasyonunu artırır. Th1 tipi immün cevabın gelişimini yönlendirir ve B lenfosit farklılaşmasında güçlü bir kostimulatördür. Sistemik veya lokal uygulanışını takiben güçlü bir anti-tümör etki gösterir. Agresif mikrometastatik tümörlerde bile küratif bir immün cevaba neden olabilir. IL-12, IL-4 ile uyarılmış T lenfositleri vasıtası ile IgE sentezini inhibe eder ve Ig izotipi seçiminde rol oynar. Th altgruplarının gelişimini etkiler ve bu etkiden dolayı allerjik hastalıkların tedavisinde yararlı olabilir. Çünkü allerjen spesifik T lenfositler karakteristik olarak IL-4 ve IL-10 miktarını artırır. IL-12 uygun durumlarda kullanılırsa birçok hastalığın tedavisinde yararlı olabilir (Baykal ve ark 1998).

1.7.5. Tümör Nekrozis Faktör

TNF ve Lenfotoksin beta (LT-beta) birbirleriyle yakın ilişkili sitokinlerdir. TNF'nin hücrel kaynağı LPS ile aktive olan mononükleer fagositlerdir. T hücreleri, aktive NK hücreleri ve aktive mast hücreleri de bu proteini salgılar. İki çeşit TNF vardır. Bunlar genellikle aktif makrofajlardan salınan TNF- α (orjinal olarak kaşektin de denir) ile aktif T hücrelerinden salınan TNF- β (Lenfotoksin)'dir. İki tip TNF reseptörü vardır. Bunlar, sitotoksik aktiviteyi ve fibroblast proliferasyonunu arttıran Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü (TNFR) Tip I (75-80 kDa) ile T hücre proliferasyonuna neden olan TNFR- Tip II (55-60 kDa)'dır. Buna ek olarak TNF reseptörlerinin çözünebilen formları (sTNFR) da mevcuttur ve bunlar hücre yüzeyindeki TNF reseptörlerinin yıkımı sonucu oluşan proteinlerden kaynaklanırlar.

sTNFR'lerin biyolojik önemi TNF ile yarışıp onun etkilerini bloke etmesidir. Duyarlı tümör hücrelerinin ve virusla enfekte hücrelerin apoptozis yoluyla ölümünü sağlarlar. Sistemik olarak endojen pirojen etki gösterirler ve yüksek ateşe neden olurlar. Bu sitokinler tarafından aşırı uyarım, şiddetli doku tahribine, hatta şoka neden olabilmektedir (Güner ve ark 1997).

TNF düşük yoğunluklarda lökosit ve endotel hücreleri için lokal olarak parakrin ve otokrin düzenleyicidir. Düşük yoğunluklarda biyolojik etkileri şunlardır:

- 1) TNF, lökositlere karşı endotel hücre yüzeyini adezyon molekülleri (ICAM-I, NCAM-I ELAM-I gibi) aracılığı ile daha yapışkan hale getirerek damar endotel hücrelerinin yeni yüzey reseptörlerini eksprese etmelerine neden olur. TNF aynı zamanda nötrofillere de etki ederek endotel hücrelerinin procoagulant özelliklerini artırır.
- 2) TNF, inflamatuvar lökositleri özellikle nötrofilleri bakteri ve virusları öldürecek şekilde aktive eder.
- 3) TNF; IL-1, IL-6, kemokinler ve TNF'nin kendisini üretmek üzere mononükleer fagositleri ve diğer hücre tiplerini uyarır. IL-6 ile sinerjik etki gösterir.
- 4) TNF, viruslara karşı interferon benzeri koruyucu etki gösterir.

TNF'nin bu etkileri mikroorganizma ve viruslara karşı verilen pro-inflamatuvar yanıtta önemlidir (Güner ve ark 1997).

1.7.6. İnterferon- γ

İki farklı grubun proteinlerini kapsamaktadır. Birinci grup; genel olarak IFN- α adını alır. Yaklaşık 18 kD'lık birbirleriyle yapısal olarak ilgili 20 polipeptidin meydana getirdiği gruptur. Her biri ayrı bir genle kodlanır. Tip I IFN reseptörü tek zincirli bir polipeptit olup, Tip II IFN reseptörüne homologdur. IFN- γ , Th1 hücrelerinden salgılanmaktadır. Th2 hücrelerinin proliferasyonunun baskılanmasında görev alır. NK hücre, makrofaj, fibroblast, endotelial hücre, B ve T hücrelerin aktivasyonu, farklılaşması ve büyümesi gibi yangısal ve immün yanıtta görev almaktadır. Antijen sunan hücrelerde MHC ekspresyonunu artırır. (Sen ve Lengyel 1992). Gama-İnterferonlar (INF- γ)'a immün interferon da denir. Genellikle T-lenfosit olarak da bilinen NK hücreleri tarafından antijene cevaben sentez edilir. IL-2

etkisi ile de salgılanması sağlanır. Bu olay herhangi bir antijen etkisiyle uyarılır (Polat ve Halıcı 2012).

Tip I IFN'nın 4 temel biyolojik etkisi vardır

- 1) Tip I IFN, viral replikasyonu inhibe eder. IFN, viral RNA veya DNA replikasyonunu engelleyen 2-5 oligoadenilat sentetaz gibi enzimlerin sentezine neden olmaktadır. Tip I IFN'nin antiviral etkisi parakrin tarzdadır ve viral enfeksiyona maruz kalan hücreler komşu hücreleri korumak için IFN salgırlar.
- 2) Tip I IFN, hücrelere etki ederek hücre proliferasyonunu önler. Bu etki viral replikasyonu inhibe eden aynı enzimlerin salınımına bağlı olduğu kadar, aminoasit sentezini, özellikle triptofan gibi esansiyel aminoasitlerin sentezini önlemesine de bağlıdır.
- 3) Tip I IFN NK hücrelerinin litik potansiyelini artırır. NK hücrelerinin temel işlevi virusla enfekte olan hücreleri öldürmektir.
- 4) Tip I IFN, MHC I sınıfı molekül ekspresyonunu artırır. MHC II sınıfı moleküllerinin ekspresyonunu ise inhibe eder.

Tip I IFN, tüm bu etkileri viral enfeksiyonları yok etmek için oluşturmaktadır.

1.8. Parapoxvirus'lara Karşı İmmun Yanıt

Parapoxvirus 'lara karşı gelişen immünite hakkındaki bilgilerin çoğunun ORFV ile yapılan çalışmalardan elde edildiği bilinmektedir. Attenüe edilmemiş canlı ORFV aşısının, yaklaşık 6-8 ay boyunca koruyucu bağışıklığı sağladığı ileri sürülmüştür (Haig ve McInnes 2002). Mevcut aşılarda eksiklikleri göz önüne alındığında, ORFV'ye karşı koruyucu bağışıklık tepkisinin derinlemesine anlaşılması üzerine birçok laboratuvar tarafından çalışmalar yürütülmüştür. Mevcut kanıtlar, hücresel bağışıklığın, ORFV enfeksiyonuna karşı koruyucu bağışıklık kazandırma konusunda önemli bir rol oynayabileceğini ileri sürülmekte, enfeksiyondan korunmada antikorun rolünün az olduğu bilinmektedir. ORFV'ye karşı koruyucu bağışıklık mekanizmalarının anlaşılması, doğal ya da deneysel enfeksiyon tarafından indüklenen bağışıklığın kısa ömürlü olması nedeniyle oldukça zor ve karmaşıktır. Her ne kadar ORFV, konakçıları tekrar enfekte edebilse de reenfeksiyon sonucu

oluşan lezyonların daha küçük ve kısa süre içerisinde kaybolma özelliği göstermelerinden dolayı, lezyonların şiddetini önleme veya azaltmada humoral bağışıklığın rolü üzerine tartışmalar bulunmaktadır. Antikoru korumada ya da iyileşmede önemli olmadığını gösteren birkaç rapor bulunmaktadır. Aşılanmış olan hayvanların serumunun koruyucu olmadığını ve sonraki yıllarda aşılanmış anneden kuzularına geçen kolostrumun koruma sağlamadığını belirten çalışmalar bulunmaktadır (Buddle ve Pulford 1984, Robinson ve Mercer 1988, Mercer ve ark 1994). McKeeve ve ark. (1987) tarafından yürütülen çalışmalarda seropozitif olan kuzuların enfeksiyona karşı korunmadığı görülmüştür. Bazı araştırmacılar, antikoru önemi konusundaki tartışmalara itiraz etmişlerdir. Lloyd ve ark (2000), IgG2 ile lezyonların iyileşmesi sonrasındaki değişim arasında güçlü bir korelasyon olduğunu göstermiş olup ORFV enfeksiyonuna karşı savunmada spesifik bir izotipin önemli olduğunu ileri sürmüştür. Lloyd ve ark (2000), IgG2'nin immün yanıt ile olan ilişkisini, Buddle ve Pulford (1984)'un kolostrumdaki antikoru kuzuları ORFV enfeksiyonuna karşı korumadığını gözlemleri ile açıklamışlar, ruminantların süt ile IgG2 yerine sadece IgG1 taşıdıklarını vurgulamışlardır.

ORFV enfeksiyonuna karşı yangı ve immün yanıtlarını incelemek için diğer bir yaklaşım, lezyonlara sızan hücre tiplerinin analiz edildiği enfekte dokunun histolojisini içermektedir (Jenkinson ve ark 1990a, 1990b, 1991, 1992, Anderson ve ark 2001). Bu çalışmalar nötrofillerin, ilk olarak 24 saat içinde bölgeye hücum ederek bifazik şekilde biriktiği yönünde bilgiler verir ve enfeksiyondan 4 gün sonra ikinci bir faz izlenmektedir. Aynı zamanda epidermis içinde yer alan viral antijenin ortaya çıktığını göstermiştir (Jenkinson ve ark 1990a, 1990b). Bazofillerin bölgeye hücum etmesi ile antijenin görüntülenmesi aynı zamanda olmuştur. Enfekte kıl köklerine bitişik nekrotizan dermisin ve enfekte olan dejeneratif epidermisin altında gelişmiş yoğun bir MHC II ve DC bulunmaktadır (Jenkinson ve ark 1991). Dermiste biriken MHC II hücrelerinin, faktör XIII ekspresyonuna dayanarak ileride bir kez daha bölünebilecek başkalaşım kümesi 1 (CD1) hücreleri (asetilkolin esterase negatif) olduğu gösterilmiştir. Bu hücrelerin invazyona engel oluşturduğu ve immün yanıt veya yara onarımına karıştığı düşünülmektedir (Jenkinson ve ark 1991). İmmün yanıtta epidermal langerhans hücresi (CD1, asetil kolin esterase pozitif) ile ilişkisine dair kanıt bulunmamaktadır. Buna ek olarak, CD4+, CD8+ ve T19 / WBC + hücreleri (Jenkinson ve ark 1992) de dahil olmak üzere farklı sınıflardaki T

hücrelerinin biriktiği bildirilmiştir. Anderson ve ark (2001) ilk 8 gün içinde CD4+ T hücrelerinin ve DC'nin diğer hücre tiplerine göre daha fazla sayıda biriktiğini göstermişlerdir. CD4+ T hücreleri papillar dermiste yoğunlaşmıştır. Dermis boyunca ve bazen de virus bulaştırılmış epitelyum üstünde bulunan epidermiste CD8+ T hücreleri görülmüştür. Orf lezyonlarındaki CD8+ T hücreleri üzerine yapılan çalışmalar, bu hücrelerin viral enfeksiyonun olduğu bölgede toplanmasına rağmen, ORFV lezyonunun alt katmanındaki virus ile enfekte hücrelere ulaşamadığını ortaya koymuştur (Haig ve ark 1996b). Etkin sitolitik CD8+ T hücrelerinin varlığına rağmen virusun replikasyonu birkaç gün sürmektedir. B hücreleri genellikle virus ile enfekte epitelyum altındaki dermiste sınırlı olmaktadır. T19+ hücreleri dermis boyunca ve bazen de epidermiste bulunmaktadır.

ORFV enfeksiyonuna karşı lokal immün cevabın dinamiklerinin anlaşılması üzerine yapılan çalışmalar, enfeksiyon bölgesinden afferent ve efferent lenf drenajındaki çözünabilir mediatörler ile hücreler üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalar, koyun arka bacağındaki enfeksiyon bölgesini drenajı ile prefemoral veya popliteal lenf düğümlerinin afferent ve efferent lenf kanallarını kanüle etmekle ilgilidir (Yirrell ve ark 1991a, 1991b, Haig ve ark 1992, 1996a, 1999, Haig ve McInnes 2002). Periferik lenf düğümlerinde deriyi enfekte eden patojenlere karşı bağışıklık başlatılır. Antijen, afferent lenfatik kanallar yoluyla antijen sunan hücreler (APC) tarafından lenf yumrularına taşınır. Lenf düğümleri tarafından üretilen antikor ve sitotoksik T hücreleri efferent lenf kanalları vasıtasıyla bölgeden ayrılmakta ve enfekte bölgeye göç etmektedir. Buna ilave olarak, kandan enfeksiyon bölgesine göç eden lenfositler, pasif hareketle lenf düğümlerinden geçerek bu süreç boyunca aktive olurlar. Koyunlardaki çalışmalar, enfekte olmuş hayvanlarda ORFV'ye karşı lokal bağışıklık tepkisinin, CD4+ T hücreleri, CD8+ T hücreleri, B hücreleri ve DC içeren iki fazlı bir lenf hücresi yanıtı olduğunu göstermiştir (Haig ve McInnes 2002). Araştırmalar, CD4+ T hücrelerinin, afferent lenfteki fazla miktarda bulunan lenfosit türü olduğunu ve enfekte olmuş koyunlarda enfeksiyon sonrası 4. ve 12. günlerde en üst düzeyde olduğunu ortaya koymuştur (Haig ve ark 1996a). Benzer bir model de, enfeksiyondan sonra birden fazla zamanda toplanan afferent lenften hazırlanan lenf hücre kültüründe, granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), interleukin-1 (IL-1), IL-8, IL-2 ve IFN- γ salgılandığı görülmüştür. Budle ve Pulford (1984) yaptıkları çalışmada, tekrar enfekte olmuş hayvanlara inaktif ORFV verildiği zaman

güçlü bir bellek yanıt oluşmuştur, aslında araştırmacılar tarafından gösterilmek istenen konu gecikmeli bir aşırı duyarlılık yanıtıdır. ORFV ile enfekte dokuların sitokin analizi, ORFV'e karşı immün yanıtta baskın olan Th1 cevabı olduğunu göstermiştir (Anderson ve ark 2001). Epidermis hücre içindeki TNF- α eksprese eden hücreler, vasküler endotel ve lenfosit morfolojisine sahip karakterize edilmemiş hücreleri içermektedir. Bu hücrelerin sayısı, reenfeksiyondan sonra deride hızlı bir şekilde artış gösterir. IFN- γ mRNA'sını eksprese eden hücreler sadece reenfekte olduktan sonra tespit edilmiş ve aynı zamanda bu hücreler lenfosit morfolojisine sahip hücreler olarak saptanmıştır (Fleming ve Mercer 2007).

ORFV genomu çeşitli immünomodülatör proteinleri kodlamaktadır (Fleming ve Mercer 2007). Bunlar IL-10'nun viral versiyonu, memeli vasküler endothelial büyüme faktörü (VEGF)'nün bir versiyonu ve IFN direnç faktörünü kodlayan vaccinia E3L genini içermektedir. Buna ek olarak GM-CSF ve IL2'ye bağlanan ve bunları inhibe eden bir protein de tanımlanmıştır (Deane ve ark 2000, Weber ve ark 2013).

Virus konakçı ilişkisinde diğer önemli bir unsur, ORFV'nin immün sistemden kaçış kabiliyetinin (immün evazyon) olmasıdır. ORFV'nin doğal enfeksiyonlarda konakçı immün yanıtı çok iyi uyardığı ileri sürülmesine rağmen konakçıda tekrar tekrar enfeksiyon meydana getirebilmektedir (Haig ve McInnes 2002). Viral IL-10, örneğin tolerajenik T hücrelerinin üretimini destekleyerek, kazanılmış immün yanıtın gelişmesini engelleyen immün evazyon mekanizmasından sorumlu tutulabilmektedir (Fleming ve Mercer 2007). Diğer önemli bir mekanizma ise viral gen ürünlerine bağlı olarak antijen sunan hücrelerin azalması sonucu immün evazyonun gerçekleştiği düşünülmektedir. Farelere inaktif ORFV uygulanmasından sonra antijen sunan monosit ve makrofajlarda lokal olarak tümör baskılayıcı gen (CD95)'in aracı olduğu apoptozisi uyardığı saptanmıştır (Weber ve ark 2013). Human cytomegalovirus (HCMV) IL-10 homologu olan proteinin, dentritik hücrelerin olgunlaşması ile ilişkili apoptozisin artışına ve dentritik hücrelerin artışının tüm safhalarında uzun süren fonksiyonel değişimlere sebep olduğu belirlenmiştir (Chang ve ark 2004). ORFV tarafından meydana getirilen mekanizmanın altında yatan kompleks yapı halen önemli bir soru olarak karşımıza çıkmaktadır. ORFV'nin Th1

tipi immün yanıt tarafından ortadan kaldırılmasını geciktiren bazı kanıtlar  ne sürülmektedir (Fleming ve Mercer 2007).

ORFV, fare ve insan hücrelerinde erken sitokin sekresyonu üzerine güçlü bir etki göstermektedir (Friebe ve ark 2004). Erken proinflatuar sitokinlerin sekresyonu; monositler ya da antijen sunan hücreler tarafından IL-6, IL-8, TNF- α ve yardımcı T lenfositler tarafından IL-12, IL-16, IFN- γ gibi Th1 sitokinlerinin salınımını içermektedir. T lenfositler ya da NK hücreler tarafından IFN- γ 'nın salgılanması, ORFV aktivitesinin önemli bir unsuru olarak görülmektedir (Friebe ve ark 2004, Brandacher ve ark 2006). ORFV'nin immünomodülatör etkisi üzerine yapılan çalışmaların çoğu *in vitro* olarak yapılmış, *in vivo* olarak sadece birkaç çalışma gerçekleştirilmiştir (Anziliero ve ark 2014). Bu araştırmalardan bir tanesinde (Weber ve ark 2003) ORFV'nin genital herpesvirus ile enfekte edilen kobaylarda, hepatitis B virusu ile enfekte edilen transjenik farelerde ve herpes simplex virusu ile enfekte edilen farelerde antiviral aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Atlarda ORFV'nin imm nomodulasyonuna yönelik çalışmalarda sitokin sentezinde erken bir artış ve denge belirlendiği ifade edilmiştir (Horohow ve ark 2008, Sturgill ve ark 2011).

 naktif poxvirus üzerine gerçekleştirilen ilk araştırmalarda, mekanizmanın temelini doğal ba ışıklı ın uyarılmasının oluşturduğu ileri s r lm ştir. Son yıllardaki araştırmalarda ise bazı insanlarda meydana gelen hastalıklarda olduğu kadar insan ve kemirgen hücrelerinde de inaktif ORFV'nin aracılık ettiği immünomodülasyon mekanizması ile ilgili bilgilerin geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Son olarak da inaktif ORFV'nin, çeşitli hayvan modellerinde meydana gelen akut ve kronik viral enfeksiyonlarda antiviral etkinliği uyardığı bildirilmiştir. Antiviral etkinin, IL-12, IL-18 ve IFN- γ 'nın salınımı sonucu ağırlıklı olarak Th1 tipi immün yanıtın uyarılması ile gerçekleştiği  ne sürülmektedir. Monoklonal antikorlar kullanılarak IFN- γ aktivitesinin nötralize edilmesi sonucu, *in vivo* olarak gözlenen antiviral etkinin belirgin bir biçimde azalmasının, fare modellerinde IFN- γ 'nın bu aktivitenin anahtar mediatörü olduğu hipotezini desteklediğini gösterdiği bildirilmektedir. Bu hayvan modellerinde yangısal yanıtın ise IL-4 de dahil olmak üzere Th2 tipi sitokinlerin daha sonradan düzenlenmesi biçiminde sınırlı kaldığı belirtilmiştir (Weber ve ark 2013).

Fare kemik iliği dendritik hücreleri (BMDC) kullanılarak gerçekleştirilen in vitro çalışmaların sonuçları, inaktif ORFV'nin dendritik hücreleri aktive edebilme yeteneğinde olduğunu göstermiştir. İnaktif ORFV ile uyarıldıktan sonra, kemik iliğinden derive edilmiş normal dendritik hücreler (BM-cDC) kadar kemik iliğinden derive edilen plazmositik dendritik hücrelerin de (BM-pDC) IFN- α/β sentezledikleri bildirilmiştir. Buna ilave olarak, inaktif ORFV, BMDC'lerde TNF- α , daha sonra BM-cDC'lerin de etkisiyle IL-12/23p40 salınmasını uyardıkları belirtilmiştir. ORFV uyarımının MHC-II, MHC-I ve CD86'nın özellikle BM-cDC üzerine düzenleyici etki yaptığı vurgulanmıştır (Siegemund ve ark 2009).

İnaktif ORFV başlangıçta baskın olan Th1 tipi immün cevabını, Th2 tipi sitokin profilinin takip etmesi şeklinde gerçekleşen olaylar zinciri, insan periferik kan hücrelerinde IFN- γ IL-12, IL-18, TNF- α , IL-8, IL-6, sonra IL-10 ile IL-1RA birlikte, bunu takiben de IL-4'ün salınmasının tespiti ile doğrulanmıştır (Friebe ve ark 2004).

1.9. Virulans Faktörleri (IL-10)

Poxvirus içerisinde IL-10 benzeri genin varlığı ilk olarak ORFV'de keşfedildi (Fleming ve ark 1997). O zamandan bu yana, IL-10 benzeri genler BPSV (Delhon ve ark 2004) ve PVNZ ve yatapoxviruslarda (YLDV) (Lee ve ark 2001) ve capripoxviruslar (Lumpy skin disease virus, keçi çiçeği, koyun çiçeği) gibi diğer *parapoxvirus* 'larda da bulundu (Tulman ve ark 2001). Memelilerde IL-10, yangı, anti-viral yanıt, yardımcı T hücresi tip 1 (Th1)'in efektör fonksiyonu üzerine supresif etkilere sahip çok işlevli bir sitokindir (Moore ve ark 2001). Th1 yanıtının inhibisyonu, antijen sunan makrofajlar ve DC vasıtasıyla dolaylı olarak meydana gelir. Buna ek olarak, IL-10 ile birlikte uyarıcı fonksiyonları vardır ve Th2 yanıtları, mast hücreleri ve B hücreleri ile ilişkili T lenfositleri uyarıcı etkileri vardır.

ORFV_{NZ2}-IL-10, 21.7 kDa'lık bir molekül ağırlığına sahip 186 amino asitlik bir peptit içermesi ve BPSV-IL-10'un 185 amino asitten oluşması *parapoxvirus* 'lara ait IL-10 moleküllerinin, memelilere ait IL-10 moleküllerine nazaran daha büyük olmasını sağlamaktadır. Gen ilk olarak ortaya çıkar ve tipik poxvirus erken transkripsiyon sekansı ile çevrelenmiştir (Fleming ve ark 1997). ORFV_{NZ2}-IL-10'un öngörülen polipeptit sekansının, memeli ve herpesviruslar tarafından kodlanan IL-10 ile benzerlikleri koyunlarda %80, ineklerde %75, insanlarda %67, farelerde %64,

EBV'de %63 ve at herpesvirus 2 ile %67 oranındadır. BPSV'nin, sığır IL-10 ile benzerlik oranı % 75'dir. ORFV-IL-10 ve BPSV-IL-10'un uyuşması, doğal konakçılarına oldukça benzemektedir. ORFV IL-10 ile memelilerin IL-10 aminoasit sekans benzerliği, polipeptidin C terminali üçte ikisi üzerinde en yüksek seviyede olmasına rağmen, nükleotid seviyesindeki benzerlik daha düşüktür ve kodon kullanımdaki farklılıklar ile genel olarak ORFV genomlarının yüksek miktarda G+C içeriğini yansıtmaktadır. İlginç bir biçimde, parapoxviral IL-10'un N-terminal bölgesi, memeli veya herpesvirus IL-10'a az bir benzerlik göstermektedir (Fleming ve ark 1997).

Parapoxvirus'lara ait IL-10'un fonksiyonel karakterizasyonu bugüne kadar ORFV-IL-10 ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar bu sitokinin memeli IL-10'un tüm aktivitelerine sahip olduğunu göstermiştir. Fare, koyun ve insan hücrelerinde ORFV-IL-10'un kullanılması sonucu, makrofajlar tarafından aktive edilen LPS, TNF- α ve IL-8 üretimini ve keratinositleri aktive ettiği, perfüze merkezi arterdeki (PMA)/kalsiyum iyonoforlar ve perifer kandaki lenfositlerin uyarılması sonucu concavalin A (Con A)'den IFN- γ ve GM-CSF üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir (Haig ve ark 2002, Imlach ve ark 2002). Buna ek olarak, ORFV-IL-10 mast hücreleri ve timositin proliferasyonuna yardımcı olur (Fleming ve ark 1997, Haig ve ark 2002, Imlach ve ark 2002). APC üzerinde aktiftir ve fare kemik iliği kaynaklı DC (Lateef ve ark 2003) ve insan kanından türeyen monosit DC'nin olgunlaşması ve antijen sunumunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Parapoxviral IL-10'un bu fonksiyonlarının, yangının baskılanmasında, doğuştan gelen immün yanıtın gelişiminde ve kazanılmış bağışıklıkta rol oynayacağı ileri sürülmektedir.

1.10. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ORFV (Lyttle ve ark 1994, Ogawa ve ark 1998, Wise ve ark 1999), BPSV (Delhon ve ark 2004), PCPV (Ueda ve ark 2003) ve PVNZ'de memeli VEGF'ye homoloji içeren bir polipeptid kodlayan bir gen tanımlanmıştır. Viral VEGF'nin, ORFV lezyonlarında görülen vasküler endotel hücrelerinin yaygın olarak çoğalmasını, kan damarlarının genişlemesini ve deride kabarma meydana gelmesiyle açıkladığı düşünülmektedir. Nitekim 1890'ın başlarından itibaren yapılan raporlarda ORFV lezyonlarının tanımlanmasında "kolay kanama" gibi terimler kullanılmıştır. VEGF benzeri faktörler diğer poxviruslar tarafından kodlanmaz ve viral potansiyel

bir viral VEGF'nin diğer oluşumu, balıkların iki yakın iridovirusudur (He ve ark 2001, Lu ve ark 2005).

Memeli VEGF ailesinin üyeleri, embriyogenez ve anjiyogenez sırasında yeni kan damarların oluşumunda esas düzenleyicidir. Aile şu anda, VEGF-A, plasenta büyüme faktörü (PIGF), VEGF-B, VEGF-C ve VEGF-D'yi içermektedir (Ferrera ve ark 2003). Bu faktörler, tirozin kinaz reseptörleri VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flkl) ve VEGFR-3 (Flt-4) yoluyla endotel hücre proliferasyonu, vasküler geçirgenliği, anjiyogenez ve lenfanjiyogeneze aracılık etmektedir (Stacker ve Achen 1999). Genel olarak, VEGFR-1 hematopoetik hücre farklılaşması ve göçünde rol oynamaktadır, VEGFR-2 vasküler endotel hücresi mitojenezinde ve VEGFR-3 lenfanjiyogenezin düzenlenmesinde rol almaktadır.

1.11. *Parapoxvirus*'lar ve İmmün Sistemden Kaçış Mekanizmaları

Son on yılda *parapoxvirus*'lar, diğer poxviruslar gibi, bu grubun konakçının savunma sistemlerini geçici olarak durdurmasına ve böylelikle replikasyon için bir fırsat yaratmasına olanak sağlayan bir silah cephanesi ürettiği açıkça görülmektedir. Günümüze kadar keşfedilen immünomodülatörler, bu grubun yangı süreçleri, apoptoz, NK hücre aktivitesi ve IFN'nin antiviral etkileri gibi doğuştan gelen tepkileri ve edinilmiş bağışıklığın gelişimini hedefleyebilme yeteneğine sahip olduğunu öne sürmektedir. Bu hedefler hemen hemen tüm poxviruslar için ortak olmasına rağmen, birçok durumda *parapoxvirus*'ların kodladığı virulans faktörleri benzersizdir.

Parapoxvirus'lar yaygın olarak epidermisin içerisinde replike olmasına rağmen ORFV olgularında özellikle keratinositlerde replikasyon gözlenmektedir. Deri vücudun en büyük organıdır ve işgal durumdaki organizmalara hızlı bir şekilde cevap vermek için son derece özel bir savunma sistemi geliştirmiştir. Keratinositler, epidermiste yer alan primer immün sistem hücresidir ve yangı sitokinleri, kemotaksik faktörleri ve adezyon moleküllerini epidermal bölgedeki ekstra selüler sıvıya salınım ile spesifik olmayan uyarılara yanıt veren proinflamatuvar sinyal dağıtıcı gibi davranırlar (Bos ve Kapsenberg 1993). Non-spesifik deri yangısının ilk fazında, keratinositler IL-1 β ve TNF- α salgırlar. IL-1 β ve TNF- α , deri vasküler endotelyumu aktive eder, bu da lökositlerin endotelyuma dahil olmasını sağlayarak

adhezyon moleküllerinin ekspresyonunun regülasyonunu arttırmaktadır. Kemokinler ile birlikte, bu sitokinler lökositlerin dolaşım sisteminden epidermise göç etmesini yönlendirir. Hücrel IL-10 tarafından aktive edilen keratinositlerde TNF- α regülasyonunun azalması (Becherel ve ark 1997), kutanöz yangının erken döneminde viral IL-10'un ana hedefi olan bu hücreler tarafından proinflamatuvar sitokinlerin salgılandığını göstermektedir. *Parapoxvirus*'ların, IL-1 β veya TNF- α reseptörlerine benzer homologları ürettiklerine dair herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Ayrıca şu anda *parapoxvirus*'ların, virusla enfekte hücrelerde proinflamatuvar sinyal iletimini indüklenmesini durduran IL-10'dan başka faktörler ürettiğine dair herhangi bir kanıt da bulunmamaktadır. *Poxvirus*'lar genel olarak proinflamatuvar sitokinlerin zararlı etkilerini en aza indirmek için birden fazla strateji geliştirirler. Ancak bu virusların bir kısmı viral IL-10'u kodlamaktadır. Gelecekte virusla enfekte hücrelerde proinflamatuvar sitokinlerin indüksiyonuna yol açan hedef yolları da içine alan *Parapoxvirus* faktörlerinin keşfedilmesi beklenmektedir. Buna ek olarak, göç eden makrofajlar ve CD8+ hücreleri tarafından salgılanan proinflamatuvar sitokinlerin üretimi muhtemelen viral IL-10 tarafından engellenmektedir. Apoptozis; TNF, FAS, IFN, NK hücreleri ve sitotoksik T lenfositler (CTL) dahil çeşitli ekstraselüler uyarıcılar ve bunun yanı sıra UV ışığı, serum büyüme faktörü eksikliği ve oksijen yetersizliği gibi etkenler ve hücrede viral dsRNA'nın makromoleküler sentezi tarafından indüklenebilir. Günümüze kadar *parapoxvirus*'ların apoptozisi doğrudan inhibe eden bir faktörü kodladığı gösterilmiştir ve bu kodlamanın, sitokrom c'nin serbest bırakılmasını inhibe ederek mitokondrium vasıtasıyla meydana geldiği bildirilmiştir. (Thome ve ark 1997, Shisler ve Moss 2001, Garvey ve ark 2002a, 2002b).

Parapoxvirus'lar ile mücadelede bir başka nokta APC'lerdir ve özellikle persiste ve tekrarlayan enfeksiyonlar sırasında önemlidir. ORFV'nin kısa süreli de olsa konakçıda replikasyon kabiliyetine sahip olması, ORFV'ye karşı bir bellek yanıtın üretildiğini göstermektedir (Buddle ve Pulford 1984, Haig ve ark 1996a). Burada ki esas soru, ORFV'nin yeniden enfeksiyon olduğu zaman bellek T hücrelerinin yeniden etkinleştirilmesini nasıl bozabildiğidir. Eldeki kanıtlar, Langerhans hücrelerinin rol oynamadığı düşüncesiyle, dermal DC veya kan kaynaklı DC'nin ORFV'ye karşı immün yanıtın başlatılmasında rol oynadığını göstermektedir (Jenkinson ve ark 1991). Olaylar normal seyrederken DC, enfeksiyon bölgesinde

toplanır, antijenleri yakalar, olgunlaşır ve aktive olmamış T hücrelerine veya bellek T hücrelerine antijen sunarken yapısal kemokinlere yanıt olarak lenf nodüllerine göç eder. Tekrarlayan enfeksiyon sırasında enfeksiyon bölgesinde DC dışındaki APC'ler bulunabilir. *Parapoxvirus*'lar, bu süreci birden fazla bölgede bozma potansiyeline sahiptir. Viral salgılanan immünomodulatorler olan GIF, IL-10, CREB bağlayıcı protein (CBP) ve VEGF'nin bu işlemi inhibe etmek için ortak çalıştığı ve DC'nin ORFV ile enfekte olmuş hayvanlarda enfeksiyon bölgesinde biriktiği ileri sürülmüştür (Jenkinson ve ark 1991). ORFV replikasyonu üst seviyeye ulaştığı zaman epidermisten lenf nodülüne viral immünomodulatorler ile bu DC akışını azalttığı tespit edilmiştir (Haig ve McInnes 2002). GIF ve viral IL-10, antijen sunumunu ve lenf nodülündeki CD4+ ve CD8+ T hücrelerini harekete geçirme potansiyeline sahip olmasına rağmen, viral sitokinlerin pasif hareketle lenf nodüllerine taşındığına dair bir kanıt bulunmamaktadır. Bu durumda, viral IL-10 potansiyel olarak edinilen immün yanıtın gelişimini bloke edebilir ve tolerojenik T hücrelerinin indüksiyonu gibi immün belleğin gelişiminde etkili olabilir. GIF'in IL-2'e bağlanma özellikleri, CD8+ T hücrelerinin klonal genişlemesini bloke edebilir ve lenfotaktinin ayrılması Th1 yanıtının gelişimini etkileyebilir. ORFV'nin fare modelinde CD95 yolu ile APC de apoptozisi indüklediği ve CMV-IL-10'un DC olgunlaşması ile ilişkili apoptozisi arttırdığı gösterilmiştir (Chang ve ark 2004).

1.12. *Parapoxvirus ovis* ile İmmünmodülasyon

Viruslar immün sistemi, savunma mekanizmalarını atlatarak, baskılayarak veya tam tersine aktive ederek manupüle ederler. *Poxvirus*'lar bağışıklık sistemini manipüle etmek için birden fazla strateji kullanmaktadır. ORFV, şiddetli bir yangı sonucunda konakçının immün yanıtına rağmen kısa süre aralıklarla konakçıyı enfekte edebilir. Birkaç viral ve konakçı faktörü, ORFV'nin immün sistemden kaçış mekanizmalarına katkıda bulunur. Viral IL-10 ortoloğu bu konuya katkıda bulunabilmektedir. ORFV ayrıca antijen sunumuna doğrudan karışabilmektedir. Lokal CD95 aracılı apoptozisin indüksiyonu, antijen sunan monosit/makrofajlarda tanımlanmıştır (Weber ve ark 2007).

ORFV; fagositoz, NK hücre aktivitesi, IFN-alfa salınımı, TNF- α , IL-2 ve GM-CSF üretimini indüklemektedir. ORFV için kabul edilen bazı immünmodüle edici gen tanımlanmıştır. Bu genlere örnek olarak, IL-10 ortoloğu ve memelilerin

vasküler endotelyal büyüme faktörünün (VEGF) viral ortologları ve bir IFN direnç genini kodlayan vaccinia E3L geni dahildir. Son zamanlarda, GM-CSF ve IL-2'yi bağlayan ve inhibe eden proteinler olarak tanımlanmıştır. Bu immünmodüle edici proteinlerin çoğu, viral replikasyon sırasında sentezlenir ve virus ile enfekte olan hücreler tarafından salgılanmaktadır (Haig ve ark 1998, Weber ve ark 2007).

Weber ve ark (2003) inaktif ORFV'nin, IL-12, IL-18, IFN- γ ve diğer yardımcı T hücresi (Th) tip 1 sitokinlerin regülasyonunu arttırdığını ve IL-4'ün indüksiyonuna eşlik eden regülasyonunu azalttığını ve daha sonraki otoregülatör sitokin yanıtını indüklediğini bildirmişlerdir.

ORFV, aynı zamanda, insanların periferik kan lökositlerinde IL-12 ve IFN γ 'yı uyarmaktadır. İnaktif ORFV, yangı ve Th 1 ilişkili sitokinlerin (IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18) regülasyonunu arttırdığını, insan immün sistem hücreleri tarafından sitokin salınımı üzerinde güçlü etkilere sahip olduğunu göstermişlerdir. Buna ilave olarak anti-inflamatuar ve Th2-ilişkili sitokinlerin (IL-4, IL-10, IL-1RA) salınımı üzerine güçlü etkilere sahip olduğu ileri sürülmüştür (Friebe ve ark 2004).

Orf virusu, gen ürünlerinin ve immün sistemini modüle eden işlevlerin geniş bir yelpazesine sahiptir. Bu baskılayıcı ve uyarıcı mekanizmaların kombinasyonunun etkili bir viral yaşam stratejisi olabileceği gibi, aynı zamanda immünmodülasyonun yeni bir prensibi olarak kullanılabileceği söylenmektedir. Böyle bir terapötik ilke, öncelikle immün sisteminin aktivasyonuna veya baskılanmasına odaklanan mevcut immünterapilere göre bazı avantajlar sağlaması beklenmektedir. İnsan hücrelerinde ORFV, aynı zamanda farelerde de tanımlanan kıyaslanabilir sitokin ağını indüklemiştir. ORFV, TNF- α ve IL-12 salınımını ve preaktif T hücrelerinde IFN- γ salgısını uyarmaktadır. Bu nedenle, ORFV farelerde olduğu gibi insanlarda da benzer koruyucu etkileri ifade edilebilmektedir. Mevcut veriler, ORFV'nin veya ilgili ilaçların, kronik viral enfeksiyonun tedavisinde önemli yan etkilere yol açmadan etkili olabileceğini düşündürmektedir. Oto-regülatör sitokin kaskadı, Hepatit B Virus (HBV) veya Herpes Simplex Virus (HSV) dışındaki virüslara karşı da aktif olabilmektedir. Bunlara ek olarak ORFV'nin, kanser veya bağışıklık bozuklukları gibi diğer endikasyonlarda da faydalı olabileceği yönünde görüşler ileri sürülmüştür (Weber ve ark 2007).

1.13. İmmunoterapide *Parapoxvirus*'lar

ORFV, potansiyel immün sistemden kaçma faktörlerini kodlamasına rağmen, attenüe D1701 suşu, çeşitli immünostimülatör özelliklere sahiptir (Mayr ve ark 1989, Forster ve ark 1994, Fachinger ve ark 2000a, Fachinger ve ark 2000b). Buna ek olarak, doğal konakçıda bulunan lezyonlu bölgenin çevresinde oluşan yoğun miktarda DC birikiminin bazı kimyasal aktivitelerin olduğuna işaret ettiği düşünülmektedir. Bu özellikler, immünomodülatör olarak ruhsatlandırılan “paraimmünite uyarıcısı” adı verilen ilaçların gelişmesine yol açmıştır (Buttner 1993, Fachinger ve ark 2000a, Kruse ve Weber 2001). İnaktif ORFV D1701 ile yapılan çalışmalar, IL-12, IL-18, IFN- γ ve diğer Th1 sitokinlerinin regülasyonunu arttıran karmaşık bir oto regülatör sitokin yanıtını indüklediğini ve arkasından IL-4 indüksiyonunun eşlik ettiği regülasyonda azalma meydana geldiğini göstermektedir (Weber ve ark 2003).

Viruslar farklı yöntemler kullanarak immün sistem hücrelerini etkilemekte ve kendilerine karşı hücresel ve humoral immün cevabın oluşmasına neden olmaktadır. Bu araştırma ile ülkemizde kullanılan attenue ORFV suşunun koyunlarda oluşturduğu *in vivo* antikor kinetiği ile sitokin profili arasındaki korelasyonun ortaya konulması ve bağışıklık üzerine muhtemel etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Araştırmada Kullanılan Hayvanlar

Tez çalışmasında, doğumlarından itibaren herhangi bir bakteriyel ya da viral aşı uygulaması yapılmamış, klinik olarak sağlıklı olduğu belirlenen ve 6-8 aylık, 10 adet erkek toklu akkaraman ırkı koyunlar araştırma materyali olarak kullanıldı. Çalışmaya başlamadan önce seçilen bu hayvanların kan serumlarında, ORFV'ye spesifik antikor taşımadığı belirlendi. Hayvanların bakım ve beslemeleri aynı şartlar altında *ad libitum* olarak gerçekleştirildi.

2.2. Serum Örnekleri

Hayvanların *vena jugularis*'inden 8-10 ml kan steril tüplere (Venoject, U.K.) alınarak (Şekil 2.1) soğuk zincir şartlarında laboratuara nakli sağlandı. Kan numuneleri pıhtılaşma gerçekleştikten sonra 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi (Hettich, Almanya). Serumlar otomatik pipet yardımıyla alınarak steril ependorf tüplerine aktarıldı. Belirtilen örnekleme zamanlarında hayvanlardan alınan kan serumları iki porsiyona ayrıldı. Bu serumlardan sitokin seviyesi belirlenecek olanlar direkt olarak derin dondurucuya kaldırılırken, nötralizan antikor tespiti gerçekleştirilecek serumlar ise 56°C'da 30 dk süreyle inaktivasyon uygulandıktan sonra derin dondurucuya kaldırıldı. Stoklanan tüm kan serumları kullanılıncaya kadar -85°C'lık derin dondurucu (Sanyo, Japonya)'da muhafaza edildi.



Şekil 2.1. Kan örneklerinin toplanması

2.3. Hücre Kültürü ve Virus

Araştırmada, standart yönteme göre hazırlanmış olan Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalında kullanılan Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) devamlı hücre kültürlerinden yararlanıldı. Hücrelerin üretilmesinde vasat olarak %5 fötal dana serumu (FDS, Biological Industries, İsrail) içeren Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium (DMEM, Biochrom, Kat No: 1361C, Almanya) kullanıldı. Denemelerde, hayvanlara yapılan inokulasyonlarda ve serum nötralizasyon testlerinde *Parapoxvirus ovis* E(P)CK₂₂ attenuue aşı suşu kullanıldı.

2.4. Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

Hücrelerin üretilmesi sırasında 50 cm² yüzey alanına sahip steril hücre kültürü şişeleri (Corning, ABD) kullanıldı. Bu şişelerde monolayer olarak üretilen ve en az %80-90 oranında yüzeyi kaplamış olan MDBK hücreleri, kullanılmadan önce 37°C'da kadar ısıtılmış PBS ile 2-3 kez yıkandı. Takiben %1'lik tripsin (Biological Industries, İsrail) içeren PBS-Versen solüsyonundan hücre yüzeyine ilave edilerek, hücreler şişe yüzeyinden kalkıncaya kadar 37°C'da bekletildi. Elde edilen hücre süspansiyonu steril santrifüj tüplerine (Isolab, Almanya) aktarıldı. 800-1000 rpm'de 5-10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak, hücre peleti bir miktar vasat ile resüspanse edildi. Takiben içinde üretme vasatı bulunan şişelere alınıp 37°C'da inkubasyona bırakıldı. Önceden pestivirus ve mikoplazma açısından kontrolleri yapılmış olan hücre süspansiyonlarından, çalışma esnasında bakteriyolojik kontrol amaçlı örnekler alınarak tekrar ekimleri yapıldı.

2.5. *Parapoxvirus ovis*'in Üretilmesi ve Titresinin Saptanması

Monolayer olarak yüzeyi kaplamış olan MDBK hücrelerinin üretildiği flasklardan hücre üretme vasatı boşaltılıp, hücre yüzeyleri PBS ile 2-3 kez yıkandı. Hazır ticari attenüe *Parapoxvirus ovis* E(P)CK₂₂ aşı suşunun 0,1 ml si 25 cm²'lik flasklara adsorbsiyon yöntemi uygulanarak ekimi yapıldı ve 37°C'da 1 saat inkubasyonun ardından, hücre üretme flaskına standart miktarda virus üretme vasatı ilave edilerek 37°C'da inkubasyona bırakıldı. Her gün hücre kültürü mikroskopunda (Olympus 1x71, Japonya) yapılan kontroller ile viral sitopatik etki (CPE) izlendi. Yaklaşık % 80-90 oranında sitopatik etki görüldüğünde dondurma-çözme işlemi

yapıldı ve solüsyon 4°C'da 3000 rpm de 30 dk santrifüj edilerek hücre tortusu uzaklaştırıldı. Elde edilen bu virus süspansiyonunun, mantar ve bakteriyel etken yönünden kontrolleri yapılarak kullanılıncaya kadar -85°C'da stoklandı.

ORFV'un titresi mikrotitrasyon metodu (Frey ve Liess 1971) kullanılarak hesaplandı. Bu amaçla 2 ml'lik ependorf tüplerinde virusun serumsuz vasat ile 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} ve 10^{-10} olacak şekilde 10 katlı dilusyonları hazırlandı. Her bir sulandırma basamağı için, 96 gözlü mikropleytin (Corning, ABD) bir sırada bulunan dört gözü ayrıldı ve bu gözlere 100'er µl virus sulandırılmasından ilave edildi. Hücre kontrol amacıyla pleytin son sıradaki dört gözüne 100'er µl serumlu vasat eklendi. Virus kontrol amacıyla dört göze 50 µl virus süspansiyonu ve 50 µl serumsuz vasat ilave edildi. Son olarak tüm gözlerin üzerine 50 µl (300.000 hücre/ml) hücre süspansiyonu konuldu. Mikropleyt, 37°C'de ve %5 CO₂'li ortamda her gün kontrolleri yapılarak inkübe edildi. Virusun üremesine bağlı CPE oluşumları 5 gün boyunca gözlemlendi. Bu sürenin sonunda virusun titresi (DKID₅₀) Kaerber metodu (1964) kullanılarak hesaplandı.

2.6. Deneysel Düzenek

Attenué virus uygulaması yapılacak olan 10 adet hayvanın inguinal bölgelerinin kılısız olan kısımlarına 0,5 ml skarifikasyon (Şekil 2.2) tarzında uygulama gerçekleştirildi (Şekil 2.3). Uygulama yapıldıktan sonraki günler hayvanların aşılama bölgeleri kontrol edildi (Şekil 2.4). Aşının hayvanlara verilmesinden önce tüm hayvanlardan alınmış olan kan serumu örnekleri; sitokin seviyeleri ve antikor titre profillerinin belirlenmesinde 0. gün (Kontrol) numuneleri olarak değerlendirildi. Hayvanlara yapılacak olan uygulamalardan 6., 12., 24., 48., 72., 96., 120. saat ile 7., 14., 21., 30., 60., 90., 120., 150. ve 180. gün sonra alınan ve laboratuvara soğuk zincirde getirilen kan örneklerinden elde edilen serumlar, attenué ORFV uygulamalarının sitokin ve antikor profilleri üzerine etkilerinin belirlenmesi için kullanılmak üzere -85°C derin dondurucuda testlere tabi tutuluncaya kadar saklandı.



Şekil 2.2. Skarifikasyon işleminin gerçekleştirilmesi



Şekil 2.3. Attenüe *Parapoxvirus ovis* aşısının uygulanması



Şekil 2.4. Attenüe *Parapoxvirus ovis* aşısı yapıldıktan sonraki görüntü (2. Gün)

2.7. Serum Nötralizasyon Testi

Uygulama yapılan hayvanlardan belirli aralıklarla alınan kan serumu örneklerinde (10 hayvana ait toplam 170 serum örneği için çift göz) ORFV'ye spesifik nötralizan antikorların saptanması amacıyla Frey ve Liess (1971)'in bildirdiği yöntemden yararlanıldı.

Serum numunelerinden nötralizasyon pleytinin her bir sırasında bulunan 2 gözüne 50'şer µl konuldu. Bu işlemten sonra serum örneklerinin üzerine ORFV'nin 100DKID₅₀ oranındaki sulandırmasından eşit miktarda ilave edildi. Virus kontrol için ayrılan 2 gözün her birine 50'şer µl serumsuz DMEM ve üzerine 100DKID₅₀ oranında sulandırılmış virustan 50'şer µl ilave edildi. Hücre kontrol için ayrılan 2 gözün her birine 100 µl %10 FDS'u içeren DMEM ilave edildi. Nötralizasyon pleyti %5 CO₂ içeren 37°C'lık etüvde 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda, hücre ve virus kontrol dahil olmak üzere, bütün gözlere MDBK hücre süspansiyonundan (300.000 hücre/ml) çok kanallı otomatik pipet yardımıyla 50'şer µl konuldu. Nötralizasyon pleytinin üzeri kapatılarak 37°C'da inkübasyona bırakıldı. Doku kültürü mikroskopunda her gün kontrolleri yapılarak, sonuçlar 5 gün boyunca izlendi.

2.8. Sitokin Seviyelerinin Ölçülmesi

Hayvanlara attenuue virus uygulamaları yapıldıktan sonra belirli aralıklarla alınan ve -85°C de muhafaza edilen kan serumu örneklerinde sitokin seviyeleri çift antikor sandviç ELISA prensibine dayalı ticari kitler kullanılarak belirlendi. Elde edilen serumlarda seviyelerinin ölçülmesi hedeflenen proinflatuar özellik taşıyan sitokinlerden IL-1 β [Sheep IL-1 β ELISA kit, (Kat.No: 201-07-0010), Sunred Biological Technology Co., Ltd. Shangai, Çin], IL-12 [Sheep IL-12 ELISA kit, (Kat.No:201-07-0081), Sunred Biological Technology Co., Ltd. Shangai,Çin], IFN- γ [Sheep IFN- γ ELISA kit, (Kat.No: 201-07-0063), Sunred Biological Technology Co., Ltd. Shangai,Çin], TNF- α [Sheep TNF- α ELISA kit, (Kat.No: 201-07-0060), Sunred Biological Technology Co., Ltd. Shangai,Çin]; antiinflatuar özellik taşıyan sitokinlerden ise IL-4 [Sheep IL-4 ELISA kit, (Kat.No: 201-07-1006), Sunred Biological Technology Co., Ltd.Shangai,Çin], IL-10 [Sheep IL-10 ELISA kit, (Kat.No:201-07-0068), Sunred Biological Technology Co., Ltd. Shangai, Çin] seviyeleri ELISA okuyucusunda tespit edildi.

Bu amaçla kit prosedürüne uygun olarak, ölçülmesi hedeflenen sitokinlere özgü monoklonal antikorlarla kaplanmış pleytlerin standart gözlerine uygun şekilde sulandırılmış standartlar, örnek gözlerine belirtilmiş olan miktarda serum numuneleri ilave edildikten sonra biotinle işaretlenmiş spesifik antikor ve streptavidine bağlanmış horseradish peroxidase (Streptavidin-HRP) konjugatı ilave edildi. Daha sonra pleytlerin üzeri steril bant yardımı ile kapatıldı ve hafifçe çalkalandı. 37°C'da 60 dk inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda pleytlerin üzerindeki bantlar dikkatli bir şekilde kaldırıldı, her bir gözün içerisinde bulunan sıvılar boşaltıldı ve daha önce hazırlanan yıkama solüsyonu ile bütün gözler 5 kez yıkandı. Daha sonra substrat solüsyonları (Chromogen sol A ve B) ilave edilip karanlık ortamda ve 37°C'da 10 dk. inkubasyona bırakıldı. En son olarak pleyt gözlerinin her birine stop solüsyonu ilave edildikten sonra 5 dk içinde 450 nm dalga boyunda ELISA reader cihazında (MWGt Lambda Scan 200, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, ABD) sonuçlar okundu. Elde edilen OD değerleri ile standart konsantrasyonları arasındaki ilişki linear regresyon denklemi kullanılarak her bir kit için Microsoft Excel programı ile parametrelerin ayrı ayrı standart eğrileri çizildi. Örneklerin yer aldığı

gözlerde okunan OD değerleri, standart eğri grafiklerinden elde edilen regresyon denklemleri kullanılarak sitokin konsantrasyon miktarlarına dönüştürüldü.

Daha sonra IL-1 β , IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-4, ve IL-10 seviyelerinin günlere göre profilleri çıkartıldı ve grup içi istatistiki karşılaştırılmaları yapıldı.

2.9. İstatistik Analizi

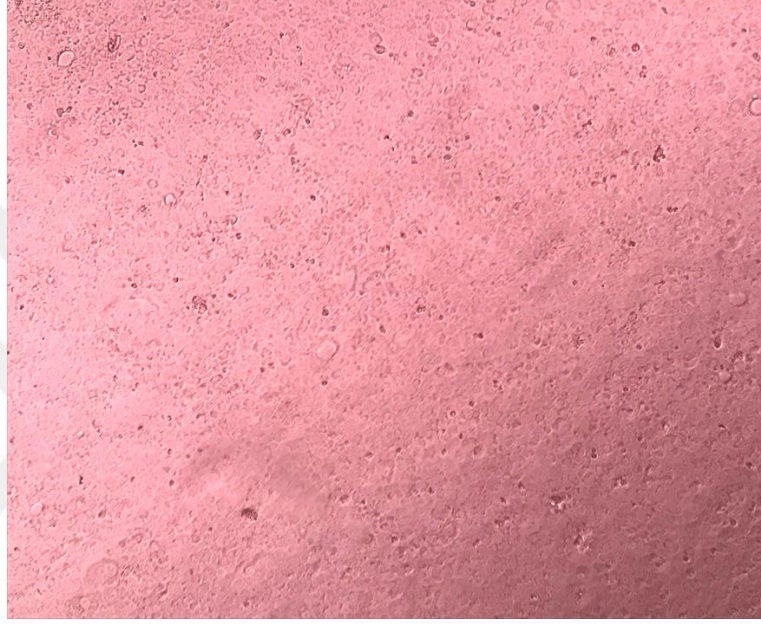
Araştırmada elde edilen veriler Tukey testi ile değerlendirildi (SPSS 22.0). P<0,05 değeri istatistiki açıdan önem sınırı kabul edildi. Sonuçlar mean $\pm$ SE olarak sunuldu.



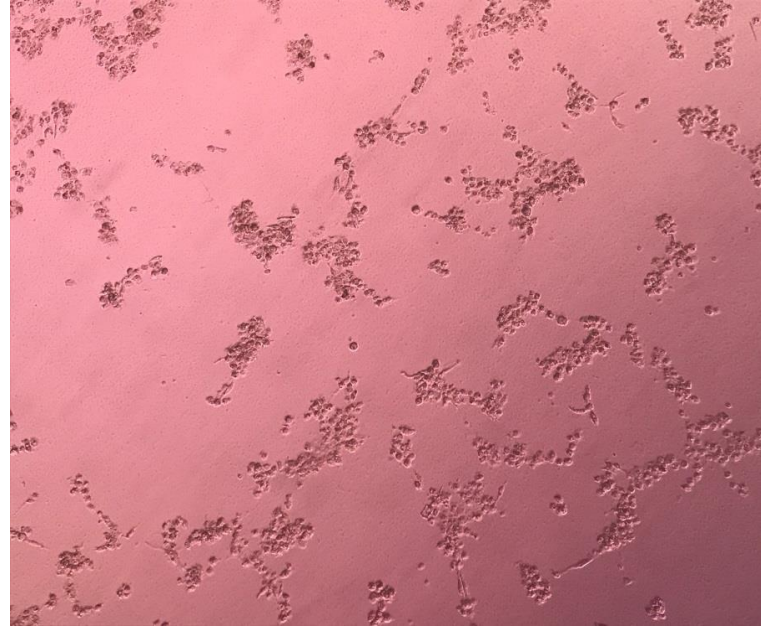
3. BULGULAR

3.1. Virusun Titresi

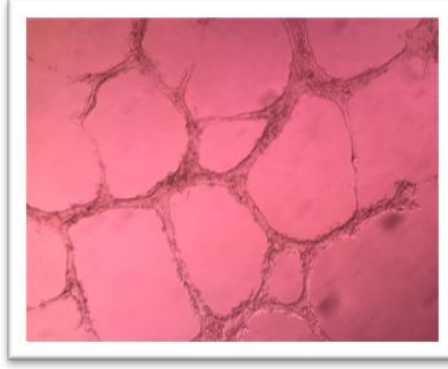
ORFV'in MDBK devamlı hücre kültürlerinde mikrotitrasyon yöntemiyle yapılan titrasyonunda, enfeksiyözite gücü Kaerber (1964) metoduna göre $DKID_{50} = 10^{-7,0}/0.1$ mL olarak hesaplandı (Şekil 3.1.- 3.12.) Serum nötralizasyon testinde ise virus 100DKID₅₀ oranında sulandırılarak kullanıldı.



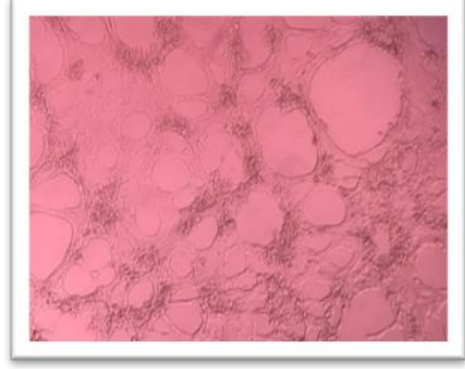
Şekil 3.1. MDBK hücre kontrol (X40)



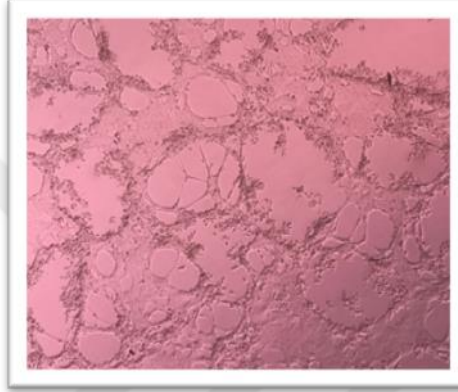
Şekil 3.2. *Parapoxvirus ovis*'in (Virus Kontrol) MDBK devamlı hücre kültüründe 4. günde oluşturduğu CPE (X40)



Şekil 3.3. ORFV'nin 10^{-1} sulandırmadaki CPE



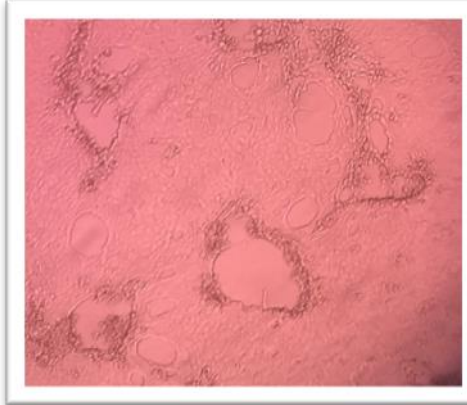
Şekil 3.4. ORFV'nin 10^{-2} sulandırmadaki CPE



Şekil 3.5. ORFV'nin 10^{-3} sulandırmadaki CPE



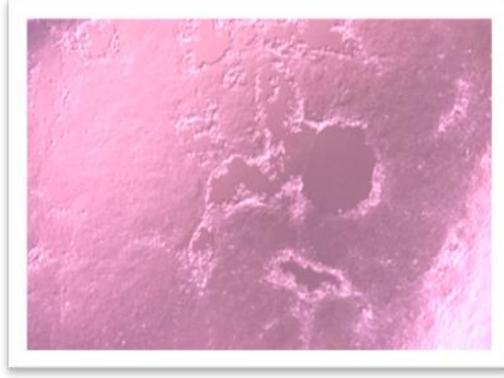
Şekil 3.6. ORFV'nin 10^{-4} sulandırmadaki CPE



Şekil 3.7. ORFV'nin 10^{-5} sulandırmadaki CPE



Şekil 3.8. ORFV'nin 10^{-6} sulandırmadaki CPE



Şekil 3.9. ORFV'nin 10^{-7} sulandırmadaki CPE



Şekil 3.10. ORFV'nin 10^{-8} sulandırmadaki CPE



Şekil 3.11. ORFV'nin 10^{-9} sulandırmadaki CPE



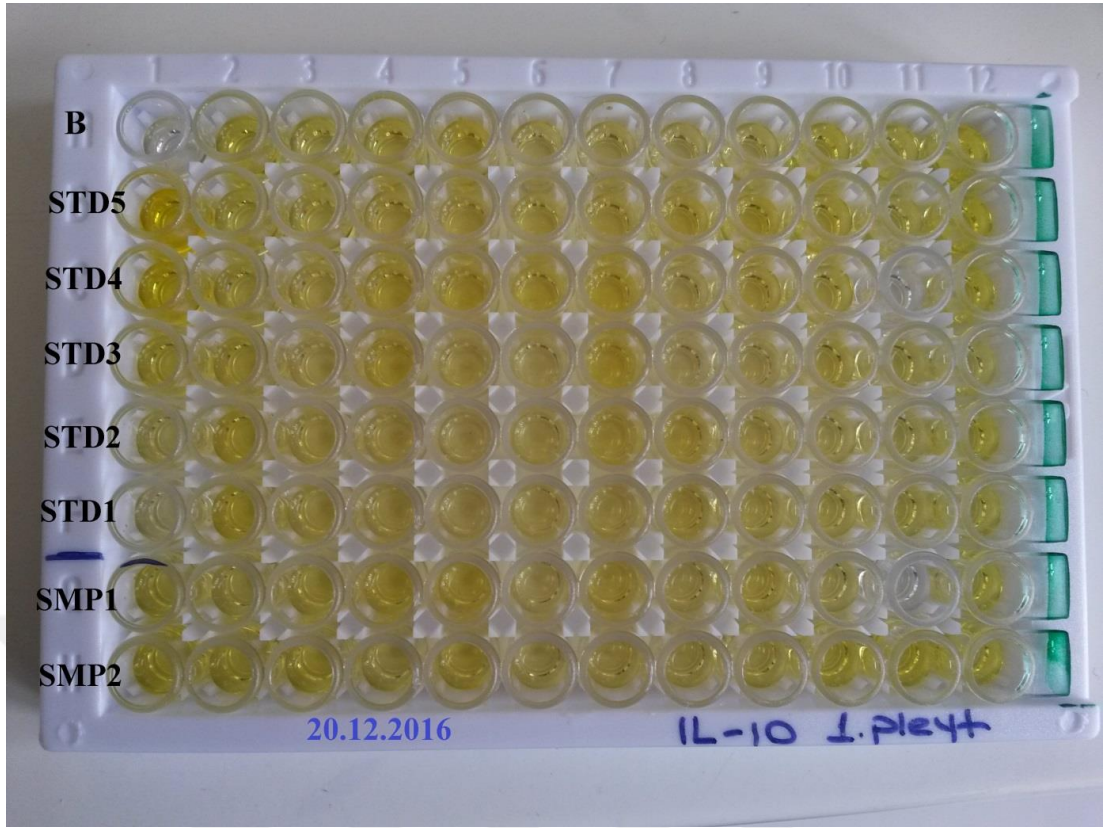
Şekil 3.12. ORFV'nin 10^{-10} sulandırmadaki CPE

3.2. Serum Nötralizasyon Testi Sonuçları

Mikronötralizasyon testiyle, 10 hayvana ait toplam 170 serum örneğinde ORFV'e karşı nötralizan antikor varlığı belirlenemedi.

3.3. Serum Örneklerinde Sitokinlerin ELISA sonuçları

Araştırmada kullanılan kan serum örneklerinde sitokin (IL-1 β , IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- γ) seviyeleri ticari ELISA kitleri kullanılarak belirlendi. Çalışmanın ELISA sonuçları Şekil 3.13. de özetlendi.



Şekil 3.13. Serum örnekleri için sandviç ELISA.

B: Kör göz, STD5: 80 pg/mL, STD4: 40 pg/mL, STD3: 20 pg/mL, STD2: 10 pg/mL, STD1: 5 pg/mL, SMP: Örnekler.

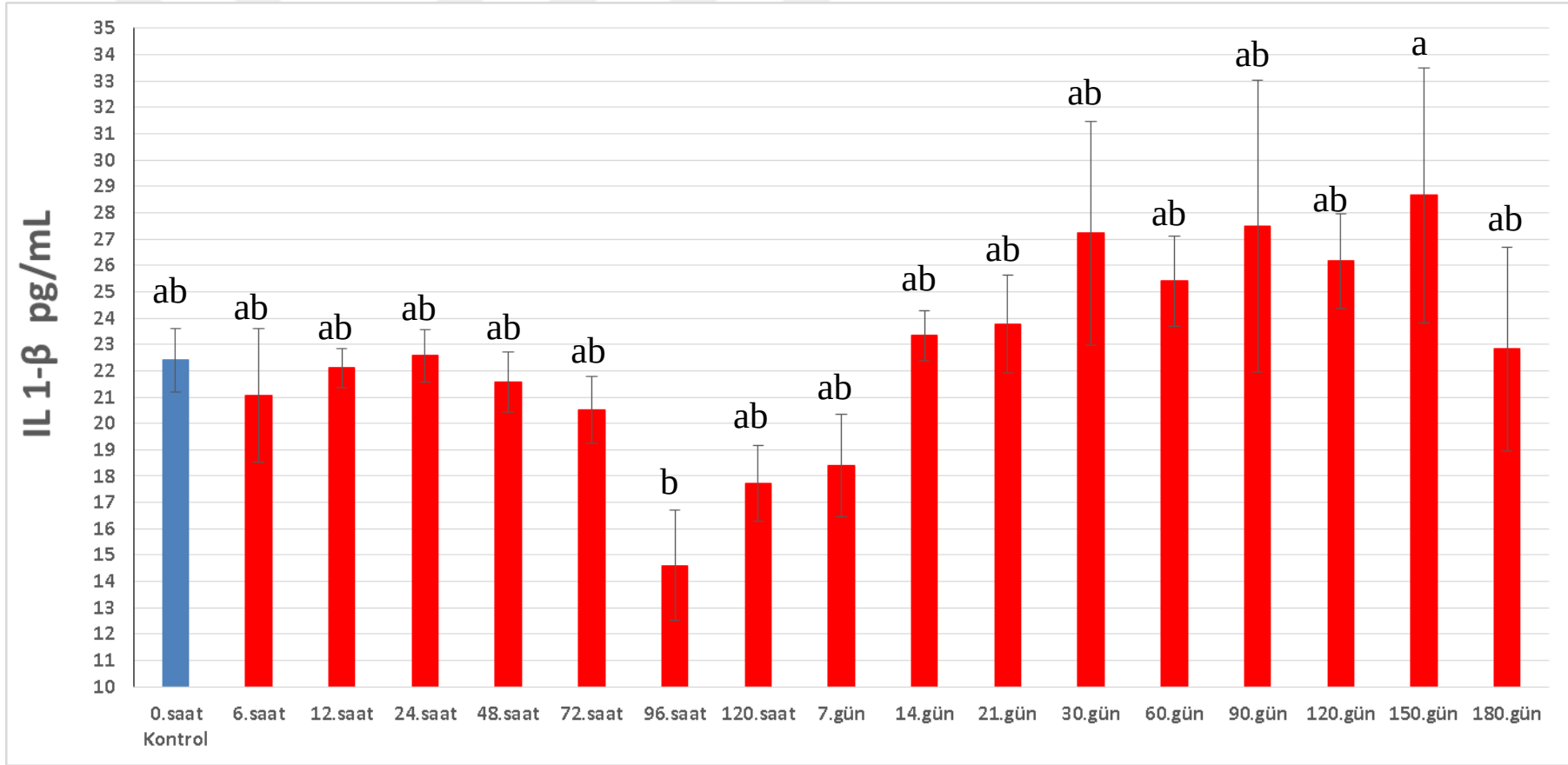
3.4. Sitokin ELISA Sonuçlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Hayvanlardan, attenuue ORFV aşısı uygulaması öncesinde alınan örnekler (Kontrol) ile uygulama sonrasında 180 gün boyunca belirli aralıklarla (6., 12., 24., 48., 72., 96., 120. saat ile 7., 14., 21., 30., 60., 90., 120., 150. ve 180. gün) alınan örneklerde belirlenen serum IL-1 β seviyeleri Şekil 3.14, IL-12 seviyeleri Şekil 3.15, IFN- γ seviyeleri Şekil 3.16, TNF- α seviyeleri Şekil 3.17, IL-4 seviyeleri Şekil 3.18, IL-10 seviyeleri Şekil 3.19’da özetlenmiş olup, toplu sonuçlar ise Çizelge 1’de sunulmuştur. Proinflamatuvar nitelik taşıyan (Th1) sitokinlerden IL-1 β , IL-12, IFN- γ ve TNF- α seviyelerinin dalgalı bir seyir gösterdiği, sırası ile 150, 90, 21 ve 180. gün pik konsantrasyona ulaştığı ancak sitokin seviyelerinde gözlenen değişimlerin istatistiki fark oluşturacak düzeyde olmadığı görüldü ($P>0,05$). Antiinflamatuvar nitelikte olan (Th2) sitokinlerden IL-4 seviyesinin, uygulama sonrası 30. günde istatistiki açıdan önemli düzeyde pik yaptığı ($P<0,05$) ve IL-10 seviyesinin ise 7. günden itibaren artış eğiliminde olduğu, 180. gün pik yaptığı ancak bu değişimlerin istatistiki fark oluşturacak düzeyde olmadığı belirlendi ($P>0,05$).

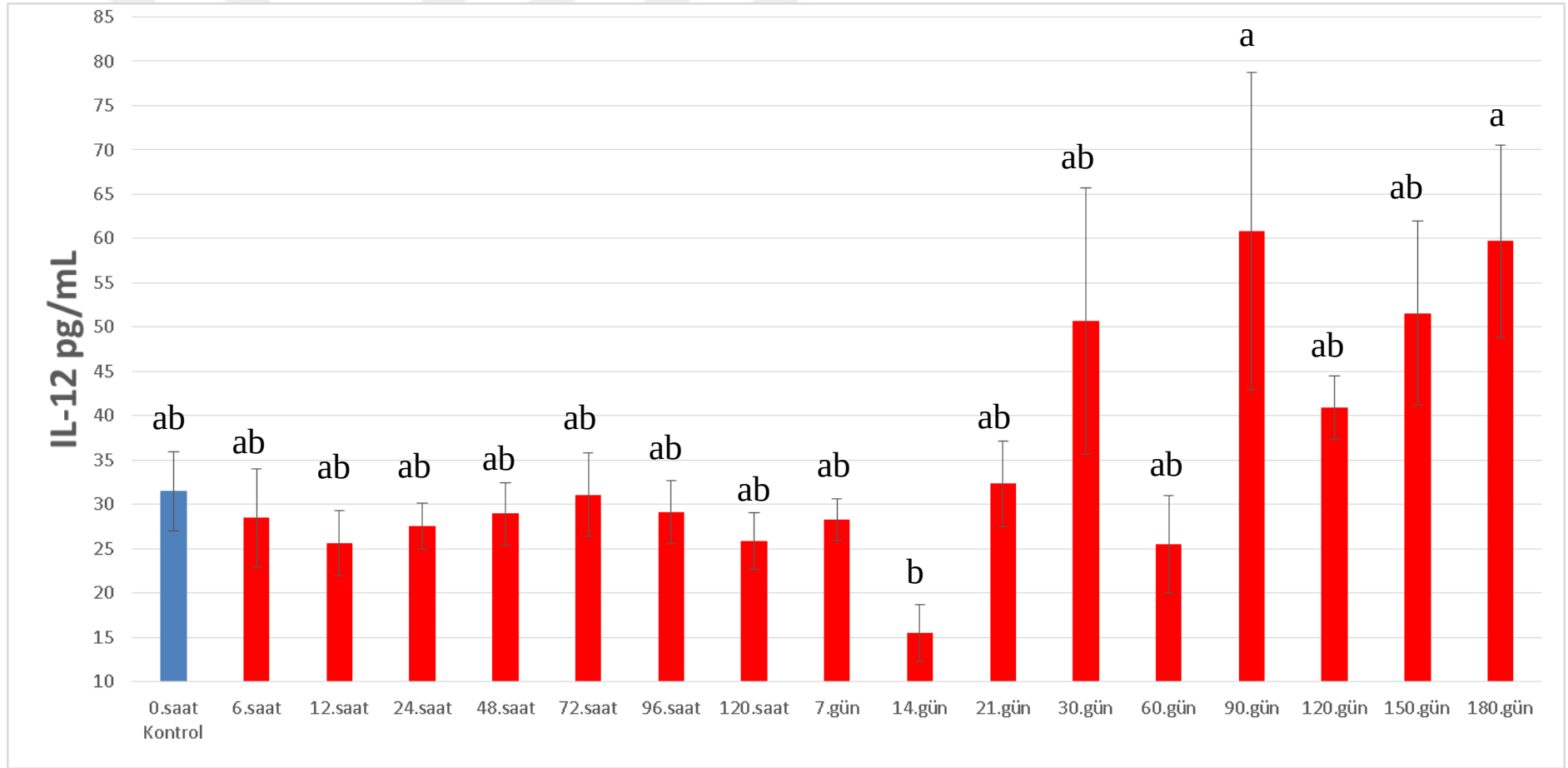
Çizelge 1. Erkek Akkaraman toklulara attenüe *Parapoxvirus ovis* (0,5 ml, inguinal bölge, skarifikasyon) uygulamasının sitokin değerlerine etkisi (mean±SE).

Parametre	IL 1-β (pg/mL)	IL-12 (pg/mL)	IFN-γ (pg/mL)	TNF-α (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
0.saat/Kontrol	22,4±1,20 ^{ab}	31,5±4,44 ^{ab}	69,8±9,31 ^{ab}	46,6±3,40 ^{ab}	33,3±3,00 ^{ab}	92,5±4,57 ^{ab}
6.saat	21,0±2,53 ^{ab}	28,5±5,58 ^{ab}	79,2±11,0 ^{ab}	51,7±2,75 ^{ab}	30,1±2,16 ^a	78,7±4,12 ^{ab}
12.saat	22,1±0,73 ^{ab}	25,6±3,68 ^{ab}	54,3±11,2 ^{ab}	49,3±2,00 ^{ab}	39,8±2,34 ^{abc}	88,4±6,73 ^{ab}
24.saat	22,5±0,99 ^{ab}	27,5±2,62 ^{ab}	31,2±5,90 ^b	32,6±3,99 ^b	42,2±2,03 ^{abc}	74,1±7,39 ^{ab}
48.saat	21,5±1,15 ^{ab}	28,9±3,50 ^{ab}	48,2±8,25 ^{ab}	34,9±5,26 ^{ab}	36,3±5,41 ^{ab}	81,2±7,75 ^{ab}
72.saat	20,5±1,28 ^{ab}	31,1±4,69 ^{ab}	32,6±8,64 ^b	48,5±2,16 ^{ab}	41,2±2,74 ^{abc}	72,6±7,80 ^{ab}
96.saat	14,6±2,08 ^b	29,1±3,53 ^{ab}	44,1±11,7 ^{ab}	44,1±3,89 ^{ab}	40,6±4,48 ^{abc}	79,1±5,50 ^{ab}
120.saat	17,7±1,43 ^{ab}	25,9±3,18 ^{ab}	47,1±8,98 ^{ab}	52,4±3,64 ^{ab}	37,8±3,42 ^{abc}	62,8±8,66 ^b
7.gün	18,4±1,93 ^{ab}	28,2±2,37 ^{ab}	62,0±12,4 ^{ab}	51,3±6,08 ^{ab}	38,2±2,57 ^{ab}	95,6±12,8 ^{ab}
14.gün	23,3±0,94 ^{ab}	15,5±3,21 ^b	66,8±12,9 ^{ab}	44,3±4,81 ^{ab}	48,4±5,28 ^{abc}	110±12,8 ^{ab}
21.gün	23,7±1,85 ^{ab}	32,3±4,83 ^{ab}	99,1±4,55 ^a	40,3±8,84 ^{ab}	53,2±8,23 ^{abc}	122±15,5 ^{ab}
30.gün	27,2±4,25 ^{ab}	50,7±15,0 ^{ab}	81,6±7,08 ^{ab}	52,6±12,1 ^{ab}	75,2±16,5 ^c	148±43,7 ^{ab}
60.gün	25,4±1,72 ^{ab}	25,5±5,48 ^{ab}	88,7±7,08 ^a	54,0±5,55 ^{ab}	65,5±2,54 ^{bc}	131±9,77 ^{ab}
90.gün	27,5±5,53 ^{ab}	60,8±17,9 ^a	67,9±16,4 ^{ab}	58,3±15,2 ^{ab}	67,7±13,4 ^{bc}	139±46,4 ^{ab}
120.gün	26,1±1,78 ^{ab}	40,9±3,54 ^{ab}	46,5±10,7 ^{ab}	62,0±5,61 ^{ab}	68,7±5,60 ^{bc}	151±11,4 ^{ab}
150.gün	28,6±4,85 ^a	51,6±10,4 ^{ab}	53,8±12,3 ^{ab}	68,6±10,1 ^{ab}	68,5±12,6 ^{bc}	153±34,0 ^{ab}
180.gün	22,8±3,86 ^{ab}	59,7±10,8 ^a	80,4±19,6 ^{ab}	70,4±13,1 ^a	68,2±9,32 ^{bc}	168±34,8 ^a

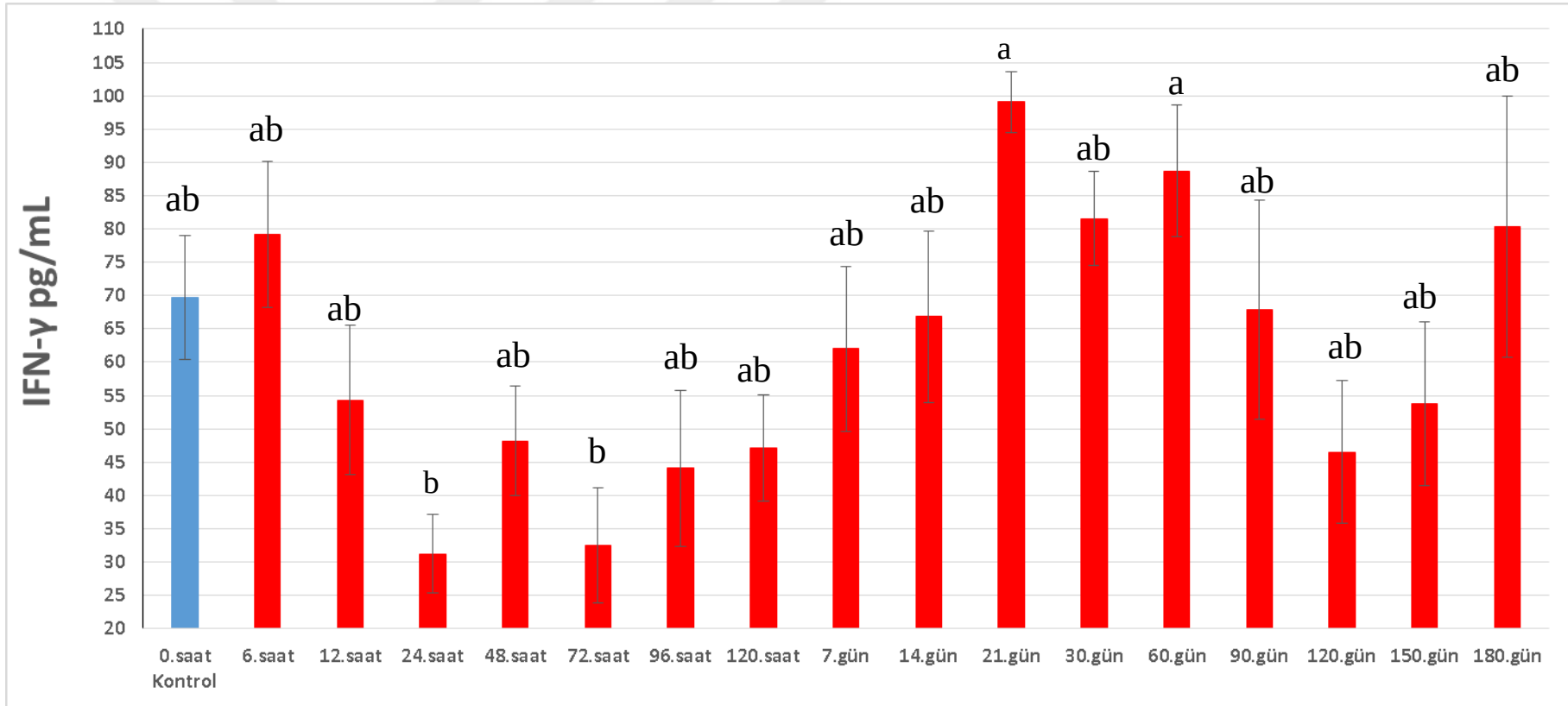
a, b, c: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki açıdan önemlidir (P<0,05).



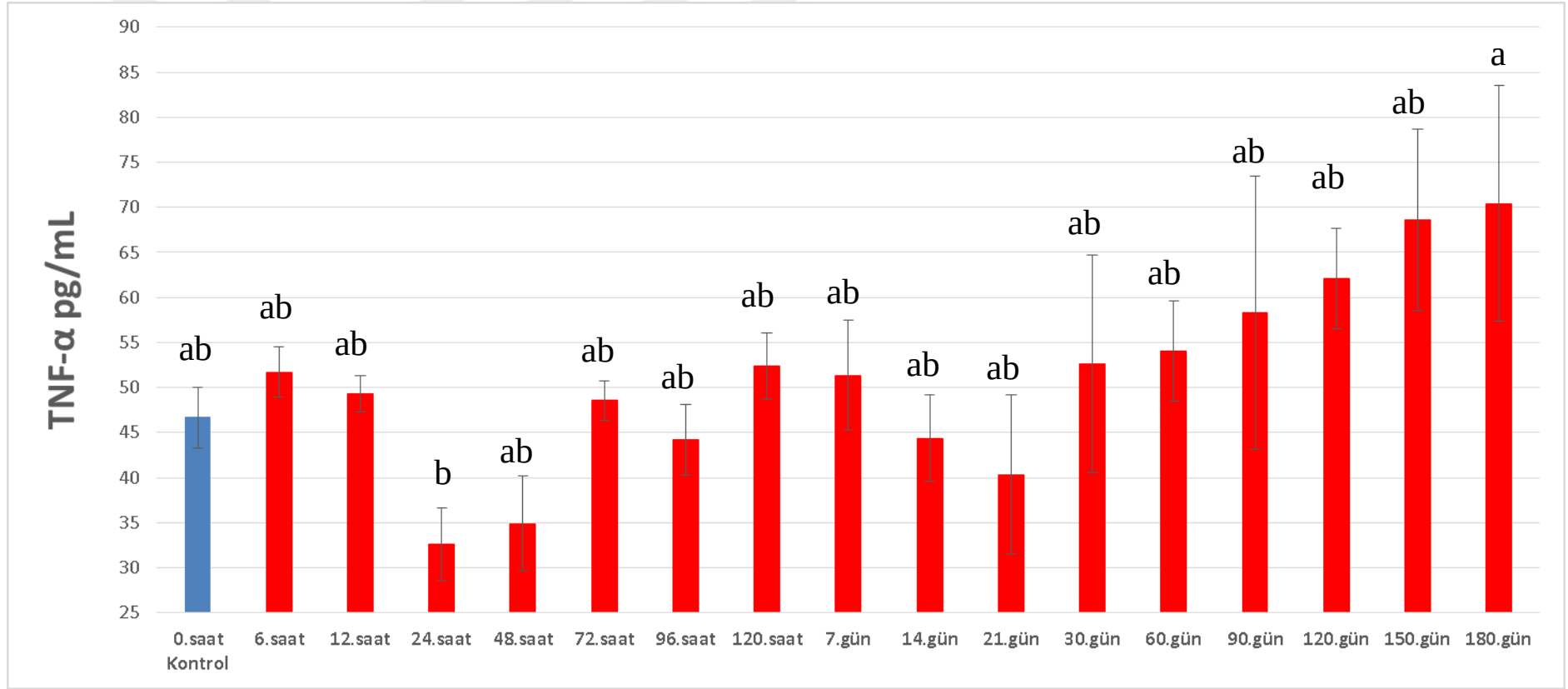
Şekil 3.14. Akkaraman erkek toklulara attenüe *Parapoxvirus ovis* uygulamasının (0,5 ml inguinal bölgeye skarifikasyon) IL 1-β (pg/mL) değerlerine etkisi (mean±SE).



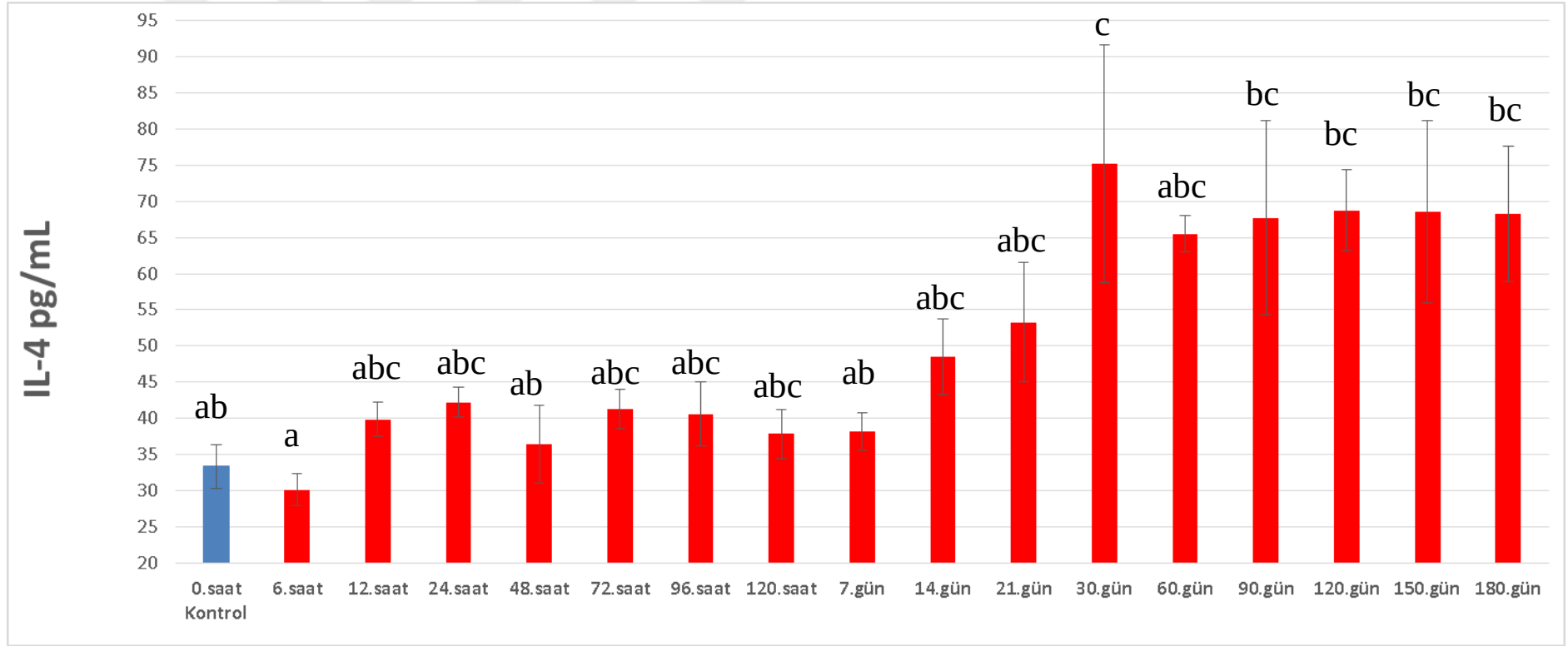
Şekil 3.15. Akkaraman erkek toklulara attenüe *Parapoxvirus ovis* uygulamasının (0,5 ml inguinal bölgeye skarifikasyon) IL-12 (pg/mL) değerlerine etkisi (mean±SE).



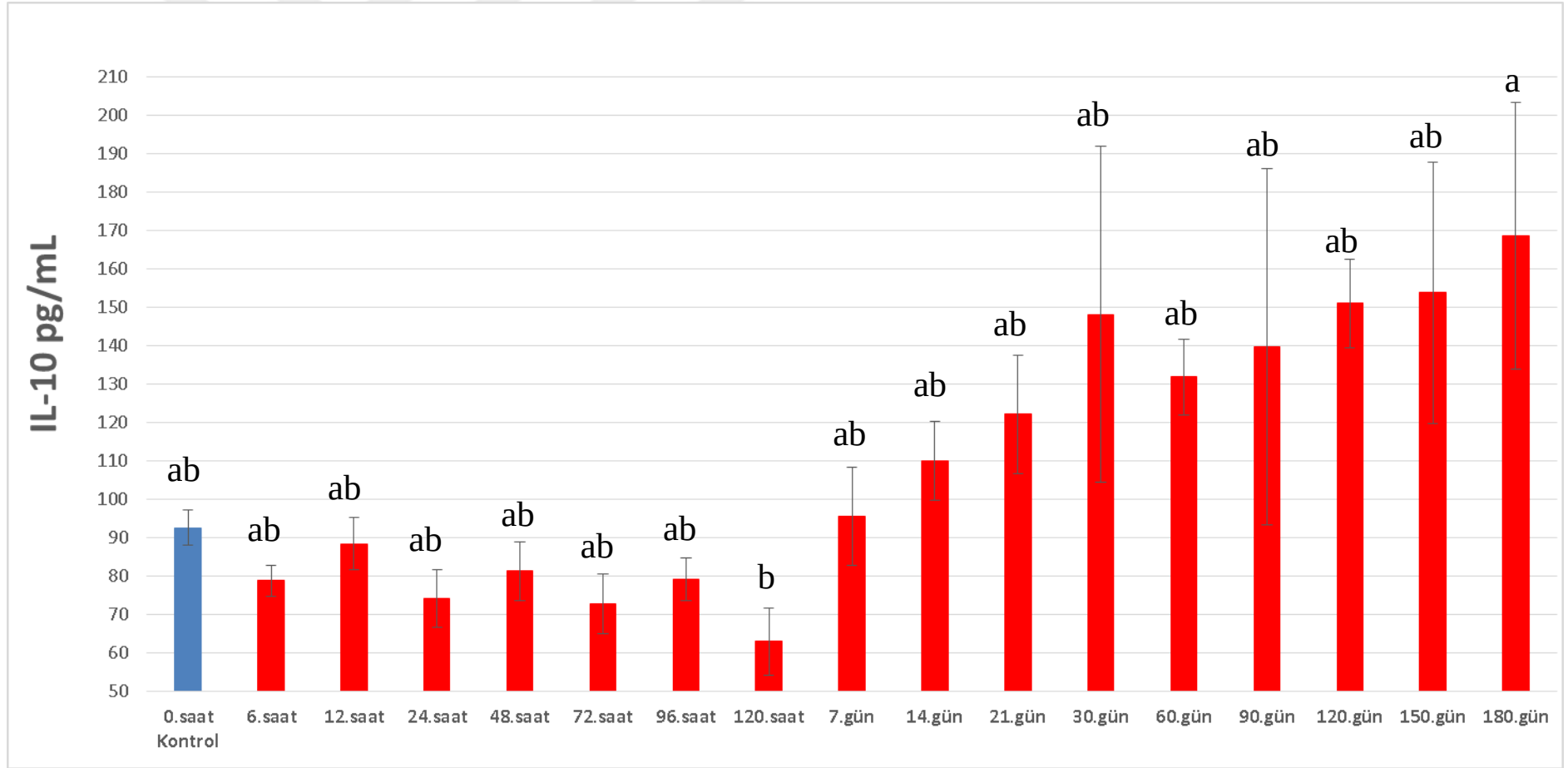
Şekil 3.16. Akkaraman erkek toklulara attenüe *Parapoxvirus ovis* uygulamasının (0,5 ml inguinal bölgeye skarifikasyon) IFN- γ (pg/mL) değerlerine etkisi (mean $\pm$ SE).



Şekil 3.17. Akkaraman erkek toklulara attenüe *Parapoxvirus ovis* uygulamasının (0,5 ml inguinal bölgeye skarifikasyon) TNF- α (pg/mL) değerlerine etkisi (mean±SE).



Şekil 3.18. Akkaraman erkek toklulara attenüe *Parapoxvirus ovis* uygulamasının (0,5 ml inguinal bölgeye skarifikasyon) IL-4 (pg/mL) değerlerine etkisi (mean±SE).



Şekil 3.19. Akkaraman erkek toklulara attenüe *Parapoxvirus ovis* uygulamasının (0,5 ml inguinal bölgeye skarifikasyon) IL-10 (pg/mL) değerlerine etkisi (mean±SE).

4. TARTIŞMA

Contagious pustular dermatitis enfeksiyonu özellikle koyun ve keçilerde gözlenmesine rağmen bazı vahşi ruminantlar ve insanlar da dahil olmak üzere yaygın bir konakçı spektrumuna sahiptir. Çiftçiler açısından ekonomik bir öneme sahip olmakla beraber enfeksiyon hayvan refahı üzerinde de kayda değer bir negatif etki meydana getirmektedir. Tüm dünyada yaygın olan ve birçok ülkede rapor edilen bu hastalığın etkeninin özellikle immün yetmezliği olan insanlarda çok daha ciddi enfeksiyonlara neden olması açısından da önem arz ettiği bilinmektedir.

Parapoxvirus ovis'in neden olduğu contagious pustular dermatitis enfeksiyonu kuzu ve oğlaklarda büyüme geriliğine, erişkin dişi hayvanlarda ise genellikle mastitise yol açarak üretim kapasitesindeki düşüş ve tedavi masraflarının artışına bağlı ağır ekonomik kayıplara neden olmakta bunun sonucunda koyun endüstrisini ciddi biçimde etkilemektedir (Kumar ve ark 2015). Aynı zamanda enfeksiyonu atlatan hayvanlarda hastalığın tekrar tekrar gözlenmesi (reenfeksiyon) ve hazırlanan aşılardan tam bir koruma sağlamadaki yetersizlikleri kontrolünü oldukça zorlaştırmaktadır. Bu durum enfekte işletmelerde virusun uzun süre devamlılığını sağlamaktadır. Bu açıdan enfeksiyonla mücadele için uygun immünoproflaktik yöntemlerin geliştirilmesi oldukça önemlidir (Hosomani ve ark 2009)

Enfeksiyonun dünya üzerinde ve ülkemizde yaygın endemik bir seyir gösterdiğine dair birçok epidemiyolojik ve serolojik çalışma mevcuttur. Hausawi ve ark (1992) tarafından Suudi Arabistan'ın farklı illerinde bulunan mezbahalarda kesimi gerçekleştirilen koyun ve keçilerden alınan serumlarda ORFV'ye spesifik antikorların araştırıldığı serolojik bir çalışmada AGID testi ile %0,6, CFT ile %6 ve ELISA ile %63 oranında pozitiflik belirlenmiştir. Aynı araştırmacılar ORFV salgını gözlenen 74 hayvandan enfeksiyonu takiben 4 hafta sonra alınan konvalesens serumlarında ise seropozitivite AGID ve CFT ile tespit edilemezken ELISA ile %54 oranında saptanmıştır. Ancak araştırmacılar, yüksek seropozitiviteye sahip olduğu saptanan mezbahada kesilen hayvanların geçmişinde enfeksiyonun olup olmadığı konusunda bir bilgi vermemişlerdir.

Ülkelere göre değişiklik göstermekle beraber hastalık ile mücadele amacıyla attenüe doku kültürü aşılı, attenüe edilmemiş canlı aşı ya da koyunlarda üretilmiş

canlı aşılar kullanılmaktadır. Kullanılan aşıya göre değişmekle beraber bağışıklığın genellikle aşılamadan üç hafta sonra şekillendiği ileri sürülse de tam bir koruyuculuk sağladıkları konusunda şüpheler bulunmaktadır. Aşı uygulamaları genellikle deri altı veya deriye skarifikasyon metoduyla uygulanmaktadır. Enfeksiyonun kontrolünde yeteri kadar immün yanıt oluşturulabilmesi amacıyla genellikle attenuue ve canlı aşıların tercih edilmesi virusun çevreye yayılmasına neden olabilir (Haig ve McInnes, 2002). Bu nedenle hastalığın görülmediği bölgelerde ve sürülerde aşıların kullanılması enfeksiyonun yayılmasında bir risk faktörü oluşturacağından dolayı dikkatli olunması gerekmektedir.

McKeever ve ark (1987) deneysel olarak enfekte ettikleri 6 adet 6 aylık kuzuda geliştirdikleri (in house) ELISA yöntemi ile 40 gün boyunca izledikleri serum antikor titrelerinin, beş hayvanda yaklaşık 5. günden itibaren yükselmeye başladığını 10-20. günlerde pik yaptığını, genellikle 20. günden sonra düşüşe geçtiğini ve 40 gün gibi kısa bir sürede oldukça düşük seviyelere indiğini belirtmişlerdir. Bir hayvanda ise 10. günden itibaren hafif bir titre artışının başladığını ve 40. güne kadar düşük titrede seyrettiğini bildirmişlerdir.

Bora ve ark (2016) Hindistan'ın Assam bölgesinde 12 farklı sürüden elde ettikleri doğal olarak enfekte 231 keçiden alınan serum örneklerinde ELISA tekniği ile %76,62 (177) gibi oldukça yüksek bir seropozitivite belirlemişlerdir.

Zeedan ve ark (2015) tarafından Mısır'da yapılan bir araştırmada ise 48 koyun, 29 keçi ve 39 adet hayvanla teması olabileceği düşünülen (veteriner hekim, bakıcı vs) insandan elde ettikleri serum numunelerini spesifik ORFV antikorları yönünden ELISA ile sırasıyla %10,26, %31,03 ve %37,5; IFAT ile %7,69, %20,69 ve %25; AGPT ile %2,5, %17,24 ve %14,5 oranında pozitiflik belirlemişler, ELISA'nın hızlı ve duyarlı bir test olduğunu vurgulamışlardır.

Çabalar ve ark (1996) tarafından ülkemizde gerçekleştirilen bir çalışmada, ORFV enfeksiyonu belirlenen bir sürüde yer alan 8-10 aylık kuzulardan dört hafta arayla iki kez kan serumu örnekleme yapılmış, serum nötralizasyon testi ile spesifik antikor tespiti ve nötralizan antikor titreleri izlenmiş, sonuçlara göre sürüde hastalığın görülmesinden 8-10 gün sonra alınan ilk örneklerde ortalama 1/151,72 titre belirlenirken birinci örneklemeden dört hafta sonra (enfeksiyonun görülmesinden yaklaşık 40. gün sonra) alınan ikinci örneklerde ortalama 1/37,30 oranında nötralizan

antikor titresi gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu durum doğal enfeksiyonun ortaya çıktığı olaylarda bile dört hafta gibi kısa bir süre içerisinde antikor titrelerinde istatistikî açıdan önemli bir düşüş saptandığını ortaya koymuştur.

Ülkemizde Kars yöresinde kuzu ve insanlarda ELISA yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen seroprevalans çalışmasında (Gökçe ve ark 2005), geçmişinde ORFV enfeksiyonu gözlenen sürülerden seçilen 320 adet hayvanda %52,81 oranında; veteriner hekim, çoban ve bakıcılardan oluşan 50 kişi de ise %5 oranında seropozitivite tespit edilmiştir.

Çabalar ve ark (1996) tarafından doğal enfekte kuzularda araştırmayı sonlandırdıkları 40. güne kadar, Housawi ve ark (2008) ise kuzu ve oğlaklarda bir salgından izole edilen saha suşu ile gerçekleştirdikleri deneysel çalışmada 28. güne kadar nötralizan antikor varlığını bildirmekle beraber bu araştırmacıların aksine Pye (1990) koyunlarda yaptığı bağışıklık çalışmalarında hücre kültürüne adapte $DKID_{50} 10^{-5}$ /ml titreye sahip ORFV suşu ile aşılanan kuzularda antikor yanıtı tespit edilmediğini, Ergin ve Köklü (1975), ORFV'nin koyun tiroid hücre kültüründe $DKID_{50} 10^{-5,4}$ ve $10^{-6,2}$ /ml titrede ürediğini, üreyen virus ile yapılan serum nötralizasyon testlerinde nötralizasyonun gerçekleşmediğini bildirmişlerdir. Yine Gülyaz ve ark (2012) tarafından attenué aşı suşu ile deneysel olarak enfekte edilen kuzularda araştırma boyunca nötralizan antikor aktivitesi gözlenemediği belirtilmiş olup araştırmacılar bu durumu virusun humoral immüniteden daha çok hücreyel immün yanıtı uyardığına bağlamışlardır. Gülyaz ve ark (2012) tarafından kullanılan attenué suşun $DKID_{50} 10^{-7}$ /0,1ml titrede kullanıldığı bu çalışmada da uygulamadan 180. güne kadar örnekleme yapılan kuzuların serum örneklerinin tümünde nötralizan antikor tespiti yapılamamıştır. Haig ve Mercer (1998) bu bulguya uygun olarak serum nötralizasyon testinin özellikle primer teşhiste güvenilir bir metot olmadığını, ORFV'nin temel olarak hücreyel immüniteyi uyardığını ve sadece düşük konsantrasyonlarda nötralizan antikor uyarımına sebep olabileceğini bildirmişlerdir. Zira antikor tespitinde, serum örneklerinde nötralizan nitelikte olmayan antikorların tespitini de mümkün kılan ELISA testinin daha duyarlı olduğunu ve başarıyla kullanıldığını vurgulayan bir çok araştırma mevcuttur (McKeever ve ark 1987, Yirrell ve ark 1991, 1994). Ancak bu çalışmada ELISA testi kullanılmadığı için

uygulama sonucunda nötralizan antikor haricinde herhangi bir antikor aktivasyonu olup olmadığı belirlenememiştir.

Viral enfeksiyonların kontrolü genellikle immün sistemin humoral ya da hücrel yanıt aktivitesine bağlıdır. B lenfositlerin uyarılması; onların proliferasyonu, farklılaşması ve patojen antijene karşı çeşitli yapıdaki antikorların sentezlenmesine yol açmakla beraber immünolojik yanıt aynı zamanda çok çeşitli alt tipe farklılaşabilen T lenfositlerin uyarılmasını ve biyolojik mekanizmaların büyük bir çoğunluğundan sorumlu olan sitokinleri de içine alan kompleks bir sistemden oluşmaktadır. Antijen sunucu hücreler ve monosit/makrofajlarla beraber T lenfositler heterojen bir yapıya sahip düzenleyici proteinlerin kaynağı olarak kabul edilmektedirler ki adı geçen bu hücrelerdeki herhangi bir fonksiyon bozukluğu sitokin sentezini etkileyebilir ve bunun sonucunda immün yanıt gelişiminde bazı problemler ve immün yetmezlik şekillenebilir (Trinchieri ve ark 1993).

Avcı ve ark (2015) intraperitoneal inaktif ORFV (iORFV, Zylexis®) inokulasyonu sonucu 24 saat boyunca izledikleri ratlarda TNF α , IL-10 ve IL-12 seviyelerinin sırasıyla 16., 8. ve 4. saatlerde pik yaptığını ancak IL-10 ve IL-12 düzeylerinde kontrol serumlarına göre istatistiki bir fark göstermeksizin dalgalanma olduğunu, Anziliero ve ark (2014) ise farelerde proinflatuvar sitokinlerden TNF α 'nın 24. saatte pik seviyeye ulaştığını bildirmişlerdir. *In vivo* hayvan modellerinde gerçekleştirilen çalışmalara uygun olarak (Friebe ve ark 2004) iORFV'nin *in vitro* ortamda insan kan monosit ya da APC hücrelerinde IL-12 ve IL-18 ile beraber TNF- α , IL-8 ve IL-6 salınımını uyardığı, proinflatuvar cevabın antinflatuvar IL-4, IL-10 ve IL-1RA sitokinlerinin induksiyonuna eşlik ettiği ve bunun sonucu ORFV tarafından uyarılan immün yanıt üzerine sınırlayıcı bir etki meydana getirdiği belirtilmiştir.

Anziliero ve ark (2014) iORFV'nin 6-8 haftalık farelere intraperitoneal inokulasyonu sonucunda sitokin ekspresyonu üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada PCR ile proinflatuvar sitokinlerden IL-1 β 'nin inokulasyon sonrası 24. saat, TNF- α ve IL-8 mRNA'sının ise 48. saatte pik seviyeye ulaştığını, IFN- γ düzeyinde 48. saatte 15 katlı bir artışın, IL-12'de 24. saatte 6 kat artışın olduğu, otheregulator sitokinlerden (Th2) IL-10'nun 72. saatte, IL-4 ekspresyonunun ise 96. saatte gözlemlendiğini saptamışlardır. ELISA ile serumda IL-1, TNF- α , IL-12, IFN- γ ve IL-

10 seviyesinde belirlenen artışın PCR ile belirlenen miktarlara kinetik benzerlik gösterdiği özellikle IL-12 ve IFN- γ miktarlarındaki artışın dikkat çekici olduğunu ileri sürmüşlerdir. Araştırmanın sonucunda ORFV uygulamasının geçici ve kompleks bir sitokin cevabına neden olduğu, başlangıçta Th1 sitokinlerinin gözlemlendiği bunu Th2 sitokinlerinin takip ettiği vurgulanmıştır.

Anderson ve ark (2001)'nin önceden spesifik antikorlar yönünden negatif olduğu belirlenen 4-6 aylık Suffolk melezi koyunlarla yapmış oldukları bir çalışmada, ORFV'nin Moredun referens suşu ile skarifikasyon yöntemi kullanılarak primer enfeksiyon oluşturulan hayvanlardan alınan deri biyopsi materyallerinde *in situ* hibridizasyon yöntemi ile IFN- γ ve IL-4 mRNA'sını eksprese eden hücrelere rastlanamamasına rağmen enfeksiyondan sonraki 5, 8 ve 20. günlerde TNF- α mRNA'sını eksprese eden hücrelere rastlandığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada primer virus uygulaması gerçekleştirildikten 8 hafta sonra aynı virus ile tekrar enfekte edilen 2. grup hayvanlarda ise IFN- γ ve TNF- α mRNA'sını eksprese eden hücrelere rastlandığı ancak IL-4'e ait mRNA ekspresyonu yapan hücrelerin saptanamadığı bildirilmiştir. Hayvanlarda reenfeksiyondan hemen önce alınan örneklerde IFN- γ mRNA'sını eksprese eden hücre belirlenemezken reenfeksiyondan sonraki 2. günde bu hücrelerin ortaya çıktığı tespit edilmiştir.

İnsan (Friebe ve ark 2004), fare (Avcı ve ark 2016), kobay (Weber ve ark 2003) gibi genellikle koyun haricindeki türlerde inaktif ORFV ile yapılan birçok çalışmada virusun paraimmünite uyarıcısı olarak IL-12, IL-18, IFN- γ ve diğer Th1 sitokinlerinin regülasyonunu arttıran bir karakter gösterdiği ileri sürülmesine rağmen araştırmamızda aşı suşu uygulaması sonucu ölçülmesi hedeflenen Th1 sitokinleri olarak seçilen IL-1 β , IL-12, IFN γ ve TNF- α miktarlarında bir dalgalanma gözlenmekle beraber kontrol serumlarına göre artış yönünde istatistiki açıdan önemli bir değişim meydana gelmediği ($p>0,05$), IL-1 β seviyesinin 150. günde ($28,66\pm4,85$ pg/ml), IL-12 seviyesinin 90. günde ($60,8\pm17,9$ pg/ml), IFN γ seviyesinin 21. günde ($99,1\pm4,55$ pg/ml) ve TNF- α seviyesinin yine 180. günde ($70,4\pm13,1$ pg/ml) en yüksek düzeylere ulaştığı belirlenmiştir (Çizelge 1.). Viral antijenlere karşı immün yanıtta erken dönemde tetiklenmesi ve kısa süre içinde yüksek seviyede pik yapması beklenen Th1 sitokinler üzerine attenuue ORFV suşunun herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Özellikle hücresel immün yanıtta sorumlu Th1 sitokin düzeyini arttırması ve buna bağlı olarak yeterli immün yanıtı oluşturması düşünülen

attenué canlı aşı uygulamasının istatistiki açıdan önemli bir artışa yol açmayıp inaktif ORFV'nin kullanıldığı araştırmalarda Th1 sitokinlerinin artışına sebep olması zıt bir durum gibi gözükmeştir. Bunun muhtemel sebebi, canlı virusun hücrelerde çoğalırken immün sistemden kaçış yöntemi olarak IL-10 homologu olan bir proteini (viral IL-10, vIL-10) kodlaması (Deane ve ark 2000, Weber ve ark 2013) ve bu proteinin hücrel immüniteden sorumlu Th1 sitokinlerini baskılaması, inaktif virusta bu mekanizmanın bulunmamasından kaynaklanabilir. Nitekim vIL-10'un, koyun IL-10 sitokini gibi makrofajlardan TNF- α üretimini, periferel kan hücrelerinden de IFN- γ üretimini baskıladığı ve kositimulatör özelliğı sahip IL-3 ve IL-4 salınımında rol oynayan mast hücre proliferasyonunu uyardığı bildirilmiştir (Haig ve Mercer, 2010). ORFV'nin NZ2 adı verilen suşunda tespit edilen vIL-10'nun koyun kaynaklı IL-10 ile %80, sığır, insan ve fare kaynaklı IL-10 ile sırasıyla %75, %67 ve %64 oranında bir benzerlik gösterdiği (Fleming ve ark 1997), fare modellemesi yapılan bir araştırmada (Imlach ve ark 2002) makrofajlardan sitokin sentezini engelleyerek immünosupresyonda önemli bir rol oynadığı ortaya konulmuştur. Aynı zamanda insan ve farelere ait dendritik hücrelerin maturasyon ve fonksiyonlarını da inhibe ettiğı belirlenmiştir (Lateef ve ark 2003). Ancak bu araştırmada IL-10 sitokin düzeylerini ölçmek için kullanılan ELISA kitleri koyuna özgü olduğundan her ne kadar 7. günden itibaren bir artış gözlenirse de istatistiki bir önem taşımadığının belirlenmesi nedeniyle vIL-10 seviyesi hakkında bir bilgi veremeyeceğı, virulensi artıran bu sitokinin gen yapısı ve serumda bulunma düzeyi konusunda ayrıntılı bir araştırma yapılması gerektiğı kanısına varıldı. Bütün bunların yanında iORFV'nin kullanıldığı araştırmalarda Th1 sitokin seviyelerindeki artışın diğeri bir sebebinin piyasada satışa sunulan iORF preparatlarının polygeline gibi taşıyıcı maddeler içermelerinin immün yanıt açısından attenué aşı suşundan farklı bir uyarım meydana getirebilmesinden kaynaklanabileceğı de unutulmamalıdır.

Bu araştırmada IL-4 seviyesinin kontrol serumlarına (33,3 $\pm$ 3,00 pg/ml) göre 30. günde istatistiki fark oluşturacak biçimde pik yaptığı (75,2 $\pm$ 16,5 pg/ml) ve daha sonraki günlerde istatistiki fark göstermeksizin dalgalı bir seyir gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 1., Şekil 3.18.). Viral enfeksiyonlarda Th1 alt grubu hücreleri tarafından erken dönemde sentezlenmelerinin aksine daha geç dönemlerde tetiklenen IL-4, uyarılmamış CD4⁺ prekürsörlerinden Th2 hücrelerinin farklılaşmasını, B hücrelerinin plazma hücrelerine dönüşümünün sağlanması ve IFN- γ 'ya bağımlı

makrofaj fonksiyonlarının baskılanmasını sağlayan bir sitokindir (Abbas ve Lichtman 2007). IL-4 sitokin seviyesinde 30. günde bir pik gözlenmesine rağmen araştırmada antikor tespitinin yapılamamış olması sitokindeki bu artışın B hücrelerinin plazma hücrelerine dönüşümü için yeterli eşik seviyeye ulaşamamasından kaynaklanabilir. Bunun bir diğer nedeni ise araştırmada antikor tespitinin ortaya konulması için kullanılan serum nötralizasyon testinin, virus uyarımı sonucu düşük düzeyde oluşan ya da nötralizan özellik göstermeyen antikorların tespitinde yetersiz kalması olabilir.

Hosomani ve ark (2009) nın belirttiği gibi uygulanan aşılardan hiçbirisinin uzun süren tam bir koruyuculuğa sahip olmadığı bu nedenle hayvanların tekrar enfeksiyona yakalanabildikleri görülmüştür. ORFV ile sahada meydana gelen enfeksiyonlara karşı güçlü ve tipik bir antiviral immün yanıt olduğu ileri sürülmesine rağmen virusa karşı oluşan immün yanıtta humoral immün yanıtta daha çok hücrel immün yanıtın büyük bir rol oynadığını destekleyen deliller bulunmaktadır. ORFV ile doğal enfekte koyunların serumlarında yüksek titrede antikor olduğu ancak bu antikorların kolostrum yoluyla direkt, serum yoluyla indirekt olarak transferi sonucu kuzuları virus challenge'ına karşı korumadığı (Buddle ve Pulford, 1984, Mercer ve ark 1994) görülmüştür. ORFV'ye karşı immün yanıt kısa süreli olup hayvanlar (Haig ve Mercer 1998) ve insanlarda (Gourreau ve ark 1986) normalden daha küçük ve çabuk iyileşen reenfeksiyonlara sebep olabilmektedir. Aşılarla ilgili son çalışmalar aşı suşlarına ait büyük immünodominant proteinler kadar ORFV tarafından kodlanan virulens faktörlerinin identifikasyonu üzerine odaklanmaktadır. Virusun bu tür genlerinin identifiye edilmesi ve bunların nasıl bir fonksiyona sahip oldukları, bu bağlamda geliştirilen rekombinant aşılardan başarılı olup olmadığının ortaya konulması önemli hale gelmiştir.

Gülyaz ve ark (2012) ülkemize ait kuzu ve oğlak ORFV izolatlarının moleküler karakterizasyonları ve aşı suşu (Penorf (E(P)CK₂₂) ile aralarında çapraz korunmanın olup olmadığı konusunda yapmış oldukları çalışmada ticari Penorf (E(P)CK₂₂) ORFV aşısı ile aşılanan kuzu ve oğlaklarda aşılama sonrası kan serumlarında ORFV virusuna karşı antikor saptanamadığını; kullanılan kuzu ve oğlak ORFV izolatlarının benzer patojeniteye sahip olduğunu, tür spesifik olmadığını, kuzu izolatlarının oğlaklarda ve oğlak izolatlarının kuzularda enfeksiyon

oluşturduğunu, halen kuzu orijinli olarak bilinen Penorf aşı suşunun oğlak orijinli olduğunu, oğlak ve kuzu izolatlarına karşı koruma meydana getirmediğini saptamışlardır. Aynı zamanda ORF virusunun B2L genlerinin karşılaştırılması sonucu hesaplanan benzerlik indeksine göre E(P)CK₂₂ aşı suşunun, filogenetik olarak koyun orijinli olduğu belirlenen  ayrı izolatla %2,1 ile %2,3 arasında değişen, oğlak orijinli izolatla ise %3.1 oranında farklılık taşıdığının ortaya konulması da aşının etkinliği konusundaki şüpheleri güçlendirmiştir.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu araştırmada tüm dünyada ve ülkemizde koyun ve keçi işletmeciliğinde endemik karaktere sahip olması nedeniyle önemli enfeksiyonlardan birisi olarak görülen ORFV enfeksiyonları ile mücadelede kullanılan attenué edilmiş E(P)CK₂₂ suşunun koyunlarda nötralizan antikor ve ilk defa sitokin aktivitesi yönünden meydana getirmiş olduğu etkiler araştırıldı. Araştırmada elde edilecek verilerin ışığında humoral ve hücrel immün yanıtta aktif bir rol üstlenen sitokinlerin aşının sahadaki etkinliğini ne yönde etkilediğine dair bir fikir edinilmesi de hedeflenmiştir.

Ancak bu araştırmada kuzulara yapılan uygulama sonucu elde edilen serum örneklerinin hiçbir tanesinde nötralizan antikor saptanamamış, ELISA yöntemi ile IL-1 β , IL-12, IFN- γ , TNF- α ve IL-10 seviyelerinde kontrol serumlarına göre istatistiki açıdan önemli değişim belirlenememiş sadece IL-4 seviyesinde 30. gün istatistiki fark oluşturacak düzeyde yükselme tespit edilmiştir. Bu bulguların ışığı altında, araştırmada tek doz attenué aşı suşu kullanımının humoral immün yanıt yanında hücrel immün yanıt oluşturma kabiliyetinde de yetersiz kalabileceği düşüncesini akla getirmiştir. Buna bağlı olarak sahada aşı uygulaması yapılmasına rağmen enfeksiyona bağlı sürü problemlerinin gözlenebileceği ihtimali göz ardı edilmemelidir.

Sonuç olarak ORFV'nin IL-1 β , IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-4 ve IL-10 düzeyleri üzerine etkilerinin belirlenmesinde, daha farklı verilerin elde edilebileceği düşünülerek sitokinlere özgü mRNA ekspresyonu gerçekleştiren hücrelerin tespitine dayalı moleküler metotlar başta olmak üzere daha hassas yöntemlerin kullanılması önerilebilir. Bununla birlikte son yapılan çalışmalarla ülkemizde uzun yıllardır ORFV enfeksiyonlarına karşı kullanılan aşı suşunun filogenetik açıdan oğlak suşu olduğunun ortaya konulması yönündeki bilgiler ışığında suşun immün yanıt oluşturma kapasitesinin belirlenmesi yönündeki deneysel çalışmaların ayrıca oğlaklar üzerinde de gerçekleştirilmesinin daha gerçekçi sonuçlar verebileceği kanaatine varıldı.

6. KAYNAKLAR

- Abbas AK, Lichtman AH, 2007, Temel İmmunoloji, Çeviri Ed.Camcıoğlu Y, Deniz G, İstanbul Tıp Kitabevi, İstanbul, pp 317.
- Abu Elzein EM, Housawi FM, 1997. Severe long-lasting contagious ecthyma infection in a goat's kid. Zentralbl Veterinarmed B, 44, 561-4.
- Agger WA, Webster SB, 1983. Human orf infection complicated by erythema multiformae. Cutis, 31, 334-8.
- Anderson IE, Reid HW, Nettleton PF, McInnes CJ, Haig DM, 2001. Detection of cellular cytokine mRNA expression during orf virus infection in sheep: differential interferon-gamma mRNA expression by cells in primary versus reinfection skin lesions. Vet Immunol Immunopathol, 83, 161-76.
- Anzillero D, Weiblen R, Kreutz LC, Spilki F, Flores EF, 2014. Inactivated Parapoxvirus ovis ovis induces a transient increase in the expression of proinflammatory, Th1-related, and autoregulatory cytokines in mice. Br J Med Biol Res, 47, 2, 110-8.
- Avci O, Bulut O, Dik I. 2016. Effects of inactive parapoxvirus ovis on cytokine levels in rats. Journal of Veterinary Medical Science, 78, 1, 129-31.
- Ballasu TC, Robinson AJ, 1987. Orf virus replication in bovine testis cells: kinetics of viral DNA, polypeptide, and infectious virus production and analysis of virion polypeptides. Arch Virol, 97, 267-81.
- Baykal Y, Karaayvaz M, Kutlu M. İnterlökinler. T Klin J Med Sci. 1998; 18: 77-84.
- Becherel PA, LeGoff L, Frances C, Chosidow O, Guillosson JJ, Debre P, Mossalayi MD, Arock M 1997. Induction of IL-10 synthesis by human keratinocytes through CD23 ligation: a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent mechanism. J Immunol, 159, 5761-5.
- Bora M, Bora DP, Barman, NN, Borah B, Das S, 2016. Seroprevalence of contagious ecthyma in goats of Assam: An analysis by indirect enzyme-linked immunosorbent assay. Veterinary World, 9, 9, 1028-33.
- Bos JD, Kapsenberg ML, 1993. The skin immune system: progress in cutaneous biology. Immunol Today, 14, 75-8.
- Brandacher G, Winkler C, Schroecksnadel K, Mrgreiter R, Fuchs D, 2006. Antitumoral activity of interferon- γ involved in impaired immune function in cancer patients. Current Drug Metabol, 7, 599-612.
- Buddle BM, Dellers RW, Schurig GG, 1984. Heterogeneity of contagious ecthyma virus isolates. Am J Vet Res, 45, 75-9.
- Buddle BM, Pulford HD, 1984. Effect of passively-acquired antibodies and vaccination of the immune response to contagious ecthyma virus. Vet Microbiol, 9, 515-22.
- Burgu İ, Toker A, 1984. Isolation of Ecthyma Contagiosum virus (orf) from the gingiva of a lamb. A. Ü. Vet. Fak. Derg, 31, 2, 230-9.
- Burgu İ, Toker A, 1987. Ecthyma contagiosum virusunun (Elmadağ suşu) fiziksel ve kimyasal özellikleri ile elektron mikroskopisi üzerinde araştırmalar. A.Ü. Vet. Fak. Derg, 34, 541-8.
- Buttner M (1993) Principles of paramunization. Option and limits in veterinary medicine. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 16: 1-10
- Chang HW, Watson JC, Jacobs BL, 1992. The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. Proc Natl Acad Sci, USA, 89, 4825-9.
- Czerny CP, Waldmann R, Scheubeck T, 1997. Identification of three distinct antigenic sites in parapoxviruses. Arch Virol, 142, 807-21.
- Çabalar M, Voyvoda H, Sekin S, 1996. The case of Ecthyma Contagiosum (Orf) in a Sheep flock in Van. A Ü Vet Fak Derg, 43, 45-51.

- da Fonseca FG, Wolffe EJ, Weisberg A, Moss B, 2000a. Characterization of the vaccinia virus H3L envelope protein: topology and posttranslational membrane insertion via the C-terminal hydrophobic tail. *J Virol*, 74, 7508-17.
- da Fonseca FG, Wolffe EJ, Weisberg A, Moss B, 2000b. Effects of deletion or stringent repression of the H3L envelope gene on vaccinia virus replication. *J Virol*, 74, 7518-28.
- Deane D, McInnes CJ, Percival A, Wood A, Thomson J, Lear A, Gilray J, Fleming S, Mercer A, Haig D, 2000. Orf virus encodes a novel secreted protein inhibitor of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin- 2. *J Virol*, 74, 1313-20.
- Delhon G, Tulman ER, Afonso CL, Lu Z, de la Concha-Bermejillo A, Lehmkuhl HD, Piccone ME, Kutish GF, Rock DL, 2004. Genomes of the parapoxviruses ORF virus and bovine papular stomatitis virus. *J Virol*, 78, 168–77.
- Diker KS, 2005. İmmunoloji. 2. Baskı. Ankara, Medisan Yayınevi, 85-103.
- Dinarello CA 2000. Proinflammatory cytokines. *Chest Journal*, 118, 2, 503-8.
- Downie AW, Dumbell KR, 1956. Poxviruses. *Annu Rev Microbiol*, 10, 237-2.
- Ergin H ve Köklü A, 1975. Pendik Orijinli Ektima Suşunun Pasajı, Aşı Hazırlama İmkanları ve Bu Aşının İmmünite Süresinin Tayini, Tübitak Veterinerlik ve Hayvancılık Araştırma Grubu (VHAG), Proje no: 207, 1-11.
- Fachinger V, Schlapp T, Saalmuller A, 2000a. Evidence for a parapox ovis virus associated superantigen. *Eur J Immunol*, 30, 2962-71.
- Fachinger V, Schlapp T, Strube W, Schmeer N, Saalmuller A, 2000b. Poxvirus induced immunostimulating effects on porcine leukocytes. *J Virol*, 74, 7943-51.
- Fleming SB, McCaughan CA, Andrews AE, Nash AD, Mercer AA, 1997. A homologue of interleukin-10 is encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol*, 71, 4857-61.
- Fleming SB, Mercer AA, 2007. Genus Parapoxvirus. In: Mercer AA, Schmidt A, Weber O, editors. *Poxviruses*. Basel: Birkhäuser, p. 127-65.
- Forster R, Wolf G, Mayr A, 1994. Highly attenuated poxviruses induce functional priming of neutrophils in vitro. *Arch Virol*, 136, 219-26.
- Friebe A, Siegling A, Friederichs S, Volk HD, Weber O, 2004. Immunomodulatory effects of inactivated *Parapoxvirus ovis* (ORF virus) on human peripheral immune cells: induction of cytokine secretion in monocytes and Th1-like cells. *J Virol*, 78, 9400-11.
- Fujii SI, Lotze MT 2007. Interleukin-10 (IL-10). In *Cytokines in the Genesis and Treatment of Cancer*, Humana Press. pp.165-79.
- Gameel AA, Abu Elzein EME, Housawi FMT, Agip A, İbrahim A, 1995. Clinico-Pathological Observations on Naturally Occurring Contagious Ecthyma in Lambs in Saudi Arabia. *Revue Elev Med Vet Pays Trop*, 48(3), 233-5.
- Garvey T, Bertin J, Siegel R, Lenardo M, Cohen J, 2002. The death effector domains (DEDs) of the molluscum contagiosum virus MC159 v-FLIP protein are not functionally interchangeable with each other or with the DEDs of caspase- 8. *Virology*, 300, 217-25.
- Garvey TL, Bertin J, Siegel RM, Wang GH, Lenardo J, Cohen JI, 2002. Binding of FADD and caspase-8 to molluscum contagiosum virus MC159 v-FLIP is not sufficient for its antiapoptotic function. *J Virol*, 76, 697-706.
- Geerinck K, Lukito G, Snoeck R, De Vos R, De Clercq E, Vanrenterghem Y, Degreef H, Maes B, 2001. A case of human orf in an immunocompromised patient treated successfully with cidofovir cream. *J Med Virol*, 64, 543-9.
- Ghislain PD, Dinét Y, Delescluse J, 2001. Orf in urban surroundings and religious practices: a study over a 3-year period. *Ann Dermatol Venereol*, 128, 889-92.
- Gökçe Hİ, Genç O, Gökçe G, 2005. Seroprevalence of contagious ecthyma in lambs and human in Kars Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 29, 95-101.

- Gülyaz V, Hasöksüz M, Bulut M, Saraç F, 2012. Contagious ecthyma virus (CEV) oğlak izolatlarının moleküler karakterizasyonu ve ecthyma aşı suşu arasında çapraz koruma çalışmaları. Tübitak Tovag Proje 111O398, 1-40.
- Güner İ, Özmen D, Bayındır O, 1997. Sitokinler. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri, 17, 65-74.
- Haig DM, Deane DL, Percival A, Myatt N, Thomson J, Inglis L, Rothel J, Heng- Fong S, Wood P, Miller HR, Reid HW, 1996b. The cytokine response of afferent lymph following orf virus reinfection of sheep. *Vet Dermatol*, 7, 11-20.
- Haig DM, Deane DL, Myatt N, Thomson J, Entrican G, Rothel J, Reid HW, 1996a. The activation status of ovine CD45R+ and CD45R- efferent lymph T cells after orf virus reinfection. *J Comp Pathol* 115: 163-174
- Haig DM, Entrican G, Yirrell DL, Deane D, Millar HR, Norval M, Reid HW, 1992. Differential appearance of interferon and colony stimulating activity in afferent versus efferent lymph following orf virus infection in sheep. *Vet Dermatol*, 3, 221-9.
- Haig DM, Hopkins J, Miller HR, 1999. Local immune responses in afferent and efferent lymph. *Immunology*, 96, 155-63.
- Haig DM, Hutchinson G, Thomson J, Yirrell D, Reid HW, 1996c. Cytolytic activity and associated serine protease expression by skin and afferent lymph CD8+ T cells during orf virus reinfection. *J Gen Virol*, 77, 953-61.
- Haig DM, McInnes CJ, 2002. Immunity and counter-immunity during infection with the parapoxvirus orf virus. *Virus Res*, 88, 3-16.
- Haig DM, Mercer AA, 1998. Ovine diseases. *Orf. Vet Res*, 29,311-26.
- Haig DM, Mercer AA, 2010. Parapoxviruses, In: *Desk Encyclopedia Animal and Bacterial Virology*, Ed. Mahy BWJ, Regenmortel HV, Spain, Elsevier, p. 182-88.
- Haig DM, Thomson J, McInnes CJ, Deane DL, Anderson IE, McCaughan CA, Imlach W, Mercer AA, Howard CJ, Fleming SB, 2002. A comparison of the anti-inflammatory and immunostimulatory activities of orf virus and ovine interleukin-10. *Virus Res*, 90, 303-16.
- He JG, Deng M, Weng SP, Li Z, Zhou SY, Long QX, Wang XZ, Chan SM, 2001. Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology*, 291, 126-39.
- Hiramatsu Y, Uno F, Yoshida M, Hatano Y, Nii S, 1999. Poxvirus virions: their surface ultrastructure and interaction with the surface membrane of host cells. *J Electron Microsc (Tokyo)*, 48, 937-46.
- Horner GW, Robinson AJ, Hunter R, Cox BT, Smith R, 1987. Parapoxvirus infections in New Zealand farmed red deer. *NZ Vet J*, 35, 41-5.
- Hosamani M, Scagliarini A, Bhanuprakash V, McInnes CJ, Singh RK, 2009. Orf: An update on current research and future perspective, *Anti Infect*, 7, 879-93.
- Housawi F, Elzein ETA, Al-Naeem1 AM, Gameel A, Homaida AQ, 2008. Induced udder orf infection in sheep and goats. *Veterinarski Arhiv*, 78, 3, 217-25.
- Housawi FM, Roberts GM, Gilray JA, Pow I, Reid HW, Nettleton PF, Sumption KJ, Hibma MH, Mercer AA, 1998. The reactivity of monoclonal antibodies against orf virus with other parapoxviruses and the identification of a 39 kDa immunodominant protein. *Arch Virol*, 143, 2289-303.
- Housawi FMT, Abu Elzein EME, 2000. Contagious ecthyma associated with myiasis in sheep. *Rev sci. tech Off int Epiz*, 19,3, 863-6.
- Housawi FM, Abu Elzein EM, al Afaleq AI, Amin MM, 1992. Sero-surveillance for orf antibodies in sheep and goats in Saudi Arabia employing the ELISA technique. *J Comp Pathol*, 106(2), 153-8.
- Imlach W, McCaughan CA, Mercer AA, Haig D, Fleming SB, 2002. Orf virus encoded interleukin-10 stimulates the proliferation of murine mast cells and inhibits cytokine synthesis in murine peritoneal macrophages. *J Gen Virol*, 83, 1049-58.
- Jenkinson D, McEwan PE, Onwuka SK, Moss VA, Elder HY, Hutchison G, Reid H W, 1990. The pathological changes and polymorphonuclear and mast cell responses in the skin of specific

- pathogen-free lambs following primary and secondary challenge with orf virus. *Vet Dermatol*, 1, 139-50.
- Jenkinson DM, Hutchison G, Onwuka SK, Reid HW, 1991. Changes in the MHC class II dendritic cell population of ovine skin in response to orf virus infection. *Vet Dermatol*, 2, 1-9.
- Jenkinson DM, Hutchison G, Reid HW, 1992. The B and T cell responses to orf virus infection of ovine skin. *Vet Dermatol*, 3, 57-64.
- Kaerber G, 1964. In diagnostic procedures for viral and rickettsial disease, Public Health Ass, New York, 3, 48-50.
- Kruse N, Weber O, 2001. Selective induction of apoptosis in antigen-presenting cells in mice by Parapoxvirus ovis. *J Virol*, 75, 4699-704.
- Kumar R, Trivedi, RN, Bhatt P, Khan SH, Khurana, SK, TiwariR, Chandra R, 2015. Contagious pustular dermatitis (orf disease)–epidemiology, diagnosis, control and public health concerns. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 3(12), 649-76.
- Lateef Z, Fleming SB, Halliday G, Faulkner L, Mercer A, Baird M, 2003. Orf virus-encoded interleukin-10 inhibits maturation, antigen presentation and migration of murine dendritic cells. *J Gen Virol*, 84, 1101-09.
- Lee HJ, Essani K, Smith GL, 2001. The genome sequence of Yaba-like disease virus, a yatapoxvirus. *Virology*, 281, 170-92.
- Leonidas C, Platanias MD, Nicholas J, Vogelzang, MD, 1990. Interleukin-1: Biology, Pathophysiology, and Clinical Prospects. *The American Journal of Medicine*, 89, 621-9.
- Lin CL, Chung CS, Heine HG, Chang W, 2000. Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo. *J Virol*, 74, 3353-65.
- Lloyd JB, Gill HS, Haig DM, Husband AJ, 2000. In vivo T-cell subset depletion suggests that CD4+ T-cells and a humoral immune response are important for the elimination of orf virus from the skin of sheep. *Vet Immunol Immunopathol*, 74, 249-62.
- Lu L, Zhou SY, Chen C, Weng SP, Chan S M, He JG, 2005. Complete genome sequence analysis of an iridovirus isolated from the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Virology*, 339, 81–100.
- Lu ZY, Gu ZJ, Zhang XG, Wijdenes J, Neddermann P, Rossi JF, Klein B, 1995. Interleukin-10 induces interleukin-11 responsiveness in human myeloma cell lines. *FEBS Lett*, 377(3), 515-8.
- Mayr A, Buttner M, Wolf G, Meyer H, Czerny C, 1989. Experimental detection of the paraspecific effects of purified and inactivated poxviruses. *Zentralbl Veterinarmed B*, 36, 81-99.
- McKeever DJ, Jenkinson DM, Hutchison G, Reid HW, 1988. Studies of the pathogenesis of orf virus infection in sheep. *J Comp Pathol*, 99, 317-28.
- McKeever DJ, Reid HW, Inglis NF, Herring AJ, 1987. A qualitative and quantitative assessment of the humoral antibody response of the sheep to orf virus infection. *Vet Microbiol*, 15, 229-41.
- Mercer AA, Yirrell DL, Reid HW, Robinson AJ, 1994. Lack of cross-protection between vaccinia virus and orf virus in hysterectomy-procured, barrier maintained lambs. *Vet Microbiol*, 41, 373-82.
- Moore KW, De Waal Malefyt R, Coffman R, O'Garra A 2001. Interleukin-10 and interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 19, 683-704.
- Mosmann TR, Sad S, 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology today*, 17(3), 138-46.
- Mourtada I, Le Tourneur M, Chevrant-Breton J, Le Gall F, 2000. Human orf and erythema multiforme. *Ann Dermatol Venereol*, 127, 397-9.
- Munz E, Schillinger D, Reimann M, Mahnel H, 1986. Electron microscopical diagnosis of Ecthyma contagiosum in camels (*Camelus dromedarius*). First report of the disease in Kenya. *Zentralbl Veterinarmed B*, 33, 73-7.

- Nagington J, Horne RW, 1962. Morphological studies of orf and vaccinia viruses. *Virology*, 16, 248-60.
- Nagington J, Newton AA, Horne RW, 1964. The structure of orf virus. *Virology*, 23, 461-72.
- Ogawa S, Oku A, Sawano A, Yamaguchi S, Yazaki Y, Shibuya M, 1998. A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem*, 273, 31273-82.
- Oliveira G, Costa G, Assis F, Franco-Luiz AP, Trindade G, Kroon E, Abrahão J, 2016. Parapoxvirus. In *Molecular Detection of Animal Viral Pathogens*. CRC Press. ISO 690, pp. 881-90.
- Opal SM, DePalo VA, 2000. Anti-inflammatory cytokines. *Chest Journal*, 117, 4, 1162-72.
- Öztürk AS, Tol H, Şen İ, 2007. Zoonoz bir ektima olgusu. *Vet. Bil. Derg*, 23, 3-4, 99-101.
- Peters D, Muller G, Buttner D, 1964. The fine structure of paravaccinia viruses. *Virology*, 23, 609-11.
- Polat B, Halıcı Z, 2012. Sitokin İmmün Modülatörler, İnterferonlar, İnterlökin-2. *Türkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics*, 5, 1, 44-51.
- Pye D, 1990. Vaccination of sheep with cell culture grown orf virus. *Aust Vet J*. 67,182-83.
- Robinson AJ, Mercer AA, 1988. Orf virus and vaccinia virus do not cross-protect sheep. *Arch Virol* 101, 255-9.
- Rosenbusch RF, Reed DE, 1983. Reaction of convalescent bovine antisera with strain-specific antigens of parapoxviruses. *Am J Vet Res*, 44, 875-8.
- Saçar H, Saçar T, 2012. Orf hastalığı. *Anatol J Clin Investig*, 6, 1, 76-80.
- Sanchez RL, Hebert A, Lucia H, Swedo J, 1985. Orf. A case report with histologic, electron microscopic, and immunoperoxidase studies. *Arch Pathol Lab Med*, 109, 166-70.
- Savage J, Black MM, 1972. "Giant orf" of a finger in a patient with lymphoma. *Proc R Soc Med*, 64, 766-8.
- Scagliarini A, Ciulli S, Battilani M, Jacoboni I, Montesi F, Casadio R, Prosperi S, 2002. Characterisation of immunodominant protein encoded by the F1L gene of orf virus strains isolated in Italy. *Arch Virol*, 147, 1989-95.
- Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA, 1990. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 75(1), 40-7.
- Sen GC, 2001. Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol*, 55, 255-81.
- Shisler JL, Moss B, 2001. Molluscum contagiosum virus inhibitors of apoptosis: The MC159 v-FLIP protein blocks Fas-induced activation of procaspases and degradation of the related MC160 protein. *Virology*, 282, 14-25.
- Siegemund S, Hartl A, von Buttlar H, Dautel F, Raue R, Freudenberg MA, Fejer G, Büttner M, Köhler G, Kirschning CJ, Sparwasser T, Alber G, 2009. Conventional bone marrow-derived dendritic cells contribute to toll-like receptor-independent production of alpha/beta interferon in response to inactivated *Parapoxvirus ovis*. *J Virol*, 83, 9411-22.
- Stacker SA, Achen MG, 1999. The vascular endothelial growth factor family: signalling for vascular development. *Growth Factors*, 17, 1-11.
- Sturgill TL, Giguere S, Franklin RP, Cohen ND, Hagen J, Kalyuzhny AE, 2011. Effects of inactivated *Parapoxvirus ovis* on the cumulative incidence of pneumonia and cytokine secretion in foals on a farm with endemic infections caused by *Rhodococcus equi*. *Vet Immunol Immunopathol*, 140, 237-43.
- Suzuki T, Tahara H, Narula S, Moore KW, Robbins PD, Lotze MT, 1995. Viral interleukin 10 (IL-10), the human herpes virus 4 cellular IL-10 homologue, induces local anergy to allogeneic and syngeneic tumors. *J Exp Med*, 182, 477-86.
- Tan ST, Blake GB, Chambers S, 1991. Recurrent orf in an immunocompromised host. *Br J Plastic Surg*, 44, 465-7.

- Thomas K, Tompkins DM, Sainsbury AW, Wood A, Dalziel R, Nettleton PF, McInnes CJ, 2003. A novel poxvirus lethal to red squirrels (*Sciurus vulgaris*). *J Gen Virol*, 84, 3337-41.
- Thomas V, Flores L, Holowczak JA, 1980. Biochemical and electron microscopic studies of the replication and composition of milker's node virus. *J Virol*, 34, 244-55.
- Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinl E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer J, Schroter M, 1997. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature*, 386, 517-21
- Trinchieri G, Kubin M, Bellone G, Cassatella MA, 1993. Cytokine cross-talk between phagocytic cells and lymphocytes: relevance for differentiation/activation of phagocytic cells and regulation of adaptive immunity. *J Cell Biochem*, 53, 301-8.
- Tryland M, Klein J, Nordoy ES, Blix AS, 2005. Isolation and partial characterization of a parapoxvirus isolated from a skin lesion of a Weddell seal. *Virus Res*, 108, 83-7.
- Tulman ER, Afonso CL, Lu Z, Zsak L, Kutish GF, Rock DL, 2001. Genome of lumpy skin disease virus. *J Virol*, 75, 7122-30.
- Türütöğlu H, Avki S, 2009. Veteriner Hekimliğinde Sitokinler. Çeviri, 1. Baskı, Burdur, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, 11-47.
- Ueda N, Wise LM, Stacker SA, Fleming SB, Mercer AA, 2003. Pseudocowpox virus encodes a homolog of vascular endothelial growth factor. *Virology*, 305, 298-309.
- Weber O, Knolle P, Volk HD, 2007. Immunomodulation by inactivated Orf virus (ORFV)-therapeutic potential. In *Poxviruses*. Birkhäuser Basel: pp. 297-310.
- Weber O, Mercer AA, Friebe A, Knolle P, Volk HD, 2013. Therapeutic immunomodulation using a virus the potential of inactivated orf virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 32, 451-60.
- Weber O, Siegling A, Friebe A, Limmer A, Schlapp T, Knolle P, Mercer A, Schaller H, Volk HD, 2003. Inactivated parapoxvirus ovis (Orf virus) has antiviral activity against hepatitis B virus and herpes simplex virus. *J Gen Virol*, 84, 1843-52.
- Wilson TM, Dykes RW, Tsai KS, 1972. Pox in young, captive harbor seals. *J Am Vet Med Assoc*, 161, 611-7.
- Wise LM, Veikkola T, Mercer AA, Savory LJ, Fleming SB, Caesar C, Vitali A, Makinen T, Alitalo K, Stacker SA, 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1. *Proc Natl Acad Sci, USA*: 96: 3071-6.
- Yirrell DL, Reid HW, Norval M, Entrican G, Miller HR, 1991a. Response of efferent lymph and popliteal lymph node to epidermal infection of sheep with orf virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 28, 219-35.
- Yirrell DL, Reid HW, Norval M, Miller HR, 1991b. Qualitative and quantitative changes in ovine afferent lymph draining the site of epidermal orf virus infection. *Vet Dermatol*, 2, 133-41.
- Zamorano J, Rivas MD, Pérez-GM, 2002. Interleukin-4: A multifunctional cytokine. *Immunol*, 22(2), 215-24.
- Zeedan GS, Abdalhamed AM, Ghoneim NH, Ghazy AA. 2015. Isolation and Molecular characterization of Contagious Ecthyma (ORF) Virus from Small Ruminants and Human in Egypt. *Journal of Veterinary Advances*, 5(10), 1139-46.
- Zinoviev VV, Tchikaev NA, Chertov O, Malygin EG, 1994. Identification of the gene encoding vaccinia virus immunodominant protein p35. *Gene*, 147, 209-14.

7. EKLER

Ek. A: Etik Kurul Kararı Örneği



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ
ETİK KURUL (SÜVFEK) KARARLARI



Toplantı Tarihi	22.04.2014	Toplantı Sayısı	2014/04	Karar Sayısı	2014/26
S.Ü. Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Atilla ŞİMŞEK tarafından sunulan “Attenué Parapoxvirus Ovis’in Koyunlarda Bazı Serum Sitokin ve Antikor Seviyelerine Etkisi” başlıklı tez projesi başvurusu değerlendirilmiştir. Bu çalışma ile Orf virusunun doğal konakçısı olan koyunlarda antikor kinetiği ile sitokin profili arasındaki korelasyonun ortaya konulması ve bu korelasyon üzerine virusun attenué edilerek kullanılmasının etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 10 adet sağlıklı kuzu kullanılacağı bildirilmektedir. Başvuruda, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurul Yönergesi ilkelerine uyulduğuna, projenin araştırma etiği açısından “uygun olduğuna” oy birliği ile karar verilmiştir.					
 Prof. Dr. Nurcan DÖNMEZ Başkan		Doç. Dr. Ercan KURAR Başkan Yardımcısı (Katılmadı)			
 Prof. Dr. Mutlu SEVİNÇ Üye		 Ayşegül KURTBEOĞLU Konya Doğayı ve Hayvanları Koruma Derneği Üyesi			
 Doç. Dr. Serdar İZMİRLİ Raportör Üye		 Doç. Dr. Uğur USLU Üye		 Salih Zeki ALPTEKİN Sivil Üye	

8. ÖZGEÇMİŞ

15.05.1984 yılında Manisa'nın Akhisar ilçesinde doğmuştur. İlk, orta ve lise eğitimini Gölarmara/Manisa'da tamamlamıştır. 2003 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesini kazanmış ve 2008 yılında mezun olmuştur. Aynı yıl Ankara'da özel bir ilaç ve aşı şirketinde ürün sorumlusu olarak çalışmıştır. 2010 yılında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı tarafından açılan asistanlık sınavını kazanmıştır. Yaklaşık bir yıl sonra Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalında doktora eğitimine başlamıştır ve halen evlidir.

