

Köpek gençlik hastalığı virusu ile doğal olarak enfekte köpeklerin serebellumunda indüklenebilir nitrik oksit sentaz ekspresyonu

Murat YARIM, M.Önder KARAYİĞİT, Ayhan GACAR, Yonca B. KABAK, M.Yavuz GÜLBAHAR, Tolga GÜVENÇ, Mahmut SÖZMEN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Samsun.

Özet: Bu çalışmanın amacı, köpek gençlik hastalığı virusu (KGHV) ile doğal olarak enfekte köpek serebellumlarının beyaz maddesinde demyelinasyonla karakterize alanlarda indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve nitrotirozin (NT) ekspresyonunun immunohistokimyasal olarak incelenmesidir. Çalışmada, KGHV ile 14 adedi akut ve 9 adedi kronik olmak üzere toplam 23 adet doğal enfekte ve 6 adet enfekte olmayan kontrol köpek serebellumu kullanıldı. KGHV enfeksiyonu histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak serebellumun beyaz maddesindeki glial hücrelerde viral antijen varlığına dayanılarak doğrulandı. KGHV ile enfekte serebellumlar Luxol Fast Blue boyama ile demyelinasyonun şiddetine göre hafif (n=7), orta (n=9) ve şiddetli (n=7) olarak sınıflandırıldı. KGHV, iNOS, NT ve glial fibriler asidik proteinin (GFAP) immunpozitifliği ve immunolokalizasyonunu belirlemek için streptavidin-biotin-peroksidaz tekniği kullanıldı. KGHV immunpozitifliği enfekte köpek serebellumlarının beyaz maddesindeki astrositlerde, oligodendrositlerde ve granüler nöronlarda görüldü. Kontrol serebellumlarda iNOS ve NT immun pozitifliğinin bulunmadığı, enfekte köpek serebellumlarında ise glial hücrelerde özellikle astrositlerde immunpozitiflik olduğu belirlendi. iNOS immunpozitif astrosit sayısının kronik olgularda akut olgulara göre önemli derecede yüksek olduğu saptandı ($p < 0.05$). Hem iNOS ve hem de NT immunpozitifliği gemistositik astrositlerde görüldü. Demyelinasyon alanlarının dışındaki bölgelerde iNOS ve NT immunpozitifliğine rastlanılmadı. Demyelinasyon alanlarında iNOS immunpozitif hücre sayısı önemli derecede yüksekti ($p < 0.05$). Bu bulgular, KGHV'deki demyelinasyonun derecesi ile iNOS immunpozitifliğinin düzeyi arasında bir ilişkinin olduğunu göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Demyelinasyon, iNOS, köpek gençlik hastalığı virusu, serebellum.

Inducible nitric oxide synthase expression in cerebellum of dogs naturally infected with canine distemper virus

Summary: The aim of this study is to investigate of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and nitrotyrosine (NT) expression in the cerebellum of dogs naturally infected with canine distemper virus (CDV), a disease characterized by demyelination in the white matter of the cerebellum. Cerebellum samples collected from naturally infected twenty-three which were 14 acute and 9 chronically infected, with CDV and six non-infected dogs. The presence of CDV infection was confirmed using histopathology and immunohistochemical localization of CDV antigen in glial cells of the white matter of the cerebellum. The CDV infected cerebella were also categorized Luxol Fast Blue staining according to the severity of demyelination as mild (n=7), moderate (n=9), and severe (n=7). The streptavidin-biotin-peroxidase technique was used to detect immunolocalisation of the CDV antigen, iNOS, NT and glial fibrillary acidic protein (GFAP). CDV antigens, immunopositive astrocytes, oligodendrocytes and granular neurons were seen in the white matter of the infected dogs. In the control dogs, iNOS and NT immunopositivity were not seen in the white matter of the cerebellum. In CDV infected dogs, iNOS immunopositivity was observed especially in astrocytes in white matter of cerebellum. The number of iNOS immunopositive astrocytes were significantly higher in chronic cases compared to acute cases of CDV infected dogs ($p < 0.05$). iNOS immunopositive gemistocytic astrocytes were also immunopositive for NT. iNOS and NT immunopositivity was not detected outside the region of the demyelinated areas. The iNOS immunopositive total cell number was found to be significantly higher in severely affected demyelination areas ($p < 0.05$). These data indicated that there was a relationship between degrees of the CDV associated with demyelination and the level of iNOS immunopositivity in the glial cells.

Keywords: Canine Distemper Virus, Cerebellum, Demyelination, iNOS

Giriş

Köpek gençlik hastalığı virüsü (KGHV) merkezi sinir sisteminin beyaz ve gri maddesinde multifokal lezyonlara neden olur (37). Beyaz maddedeki lezyonlar ilerleyici bir demyelinasyonla karakterizedir (28,40). KGHV tarafından şekillendirilen demyelinasyon sürecinde

akut yangısal olmayan ve kronik yangısal safha olmak üzere iki evre belirlenmiştir (39, 45). Bazı çalışmalarda subakut evre de tanımlanmıştır (38, 44). Kronik yangısal evredeki demyelinasyonun mikroglialarla anti-viral anti-korların etkileşimi sonrasında şekillenebileceği düşünülmektedir. Akut demyelinasyon evresinin direkt virus

etkisiyle olduğu ve oligodendrositlerle sınırlı olduğu ileri sürülmüştür. Bununla birlikte demyelinasyonun tam mekanizması hala bilinmemektedir (12, 40).

Nitrik oksit (NO) serbest radikal bir gaz olup memeli dokularında nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığı ile L-argininden sentezlenir (27). Son yıllardaki çalışmalar ile NO'nin kasların gevşemesi, nöronal aktivite ve immun modülasyon gibi fizyolojik fonksiyonlara sahip olduğu ortaya konmuştur (10). NO oluşumundan sorumlu 3 enzim formu belirlenmiştir. Bunlardan nöronal NOS (nNOS), endotelial NOS (eNOS) teşkil edici formu iken üçüncüsü indüklenebilir NOS (iNOS)'dur. iNOS patolojik durumlarda makrofaj, monosit ve aktive olmuş astrositler tarafından üretilmekte, dolayısıyla iNOS'un bir çok patolojik süreçte rol aldığı bilinmektedir (20, 24). NO hücre içi uyarım ve sinirler arası iletimde rol almaktadır (25). iNOS'un deneysel otoimmun (5), bakteriyel (17) ve viral (22) meningoensefalitis olgularında eksprese olduğu rapor edilmiştir. NO'nin aşırı üretimi ve birikimi yangısal nörodejeneratif olaylarda nöron için zararlı olup iNOS artışı ve NO üretimini bloke edebilen ajanlar nöronal korunmayı sağlayabilmektedir. iNOS'un demyelinasyonla ilişkisi *in vitro* olarak gösterilmiştir (9, 32) fakat *in vivo* çalışma sayısı sınırlıdır (30). Multiple skleroz (MS) hastalığında olabilecek akut hasara bağlı gelişen demyelinasyonda NOS ekspresyonu artmış fakat bu daha çok demyelinasyon şekillenen alanlara uzak olduğu için araştırmacılar direkt olarak NO'nin demyelinasyonla ilişkisini kanıtlanamamışlardır. Hatta akut demyelinasyon olaylarında NO'nin demyelinasyondan ziyade remyelinasyona muhtemel bir katkısının olabileceği yönünde fikir belirtmişlerdir (21, 32). NO'nin diğer birçok yangısal sitokinle uyum içinde çalışarak sinir dokusunda dejenerasyona yol açtığına dair veriler mevcuttur. Daha da önemlisi peroksinitrit gibi kendisinden daha toksik yan ürünleri üreterek hücre duvarlarına zarar vermektedir. Zira, KGHV'nun yol açtığı demyelinasyonun sadece oligodendrosit kaybına bağlı olmadığı, hatta demyelinasyonun oligodendrosit kaybından önce şekillenmeye başladığı konusunda görüşler mevcuttur (28, 40).

Nitrik oksitin anti-proliferatif ve sitotoksik etkisi iNOS'un aktive olması sonucu oluşan yüksek seviyelerdeki NOS'in devamlı üretimi ile ilişkilendirilmiştir. Köpek gençlik hastalığında demyelinasyonun başlaması ve ilerlemesi hala bir araştırma konusudur. Dolayısıyla bu çalışmada NO'nin KGHV enfeksiyonunda şekillenen demyelinasyonla olan ilişkisi araştırılmış, ayrıca peroksinitrit oluşumu için kesin kanıt sayılan nitrotirozin ekspresyonu da immunohistokimyasal olarak incelenmiştir.

Materyal ve Metot

Çalışma düzeni ve örneklerin alınması: Çalışma materyalini, KGHV ile 14 adeti akut ve 9 adeti kronik olmak üzere toplam 23 adet doğal yolla enfekte ve 6 adet virüsle enfekte olmayan ve sinirsel bulgu göstermeyen farklı nedenlerden dolayı ölmüş köpek serebellumu oluş-

turdu. Serebellum örnekleri %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonunda tespit edilip alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek parafinde bloklandı ve 6 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Rutin olarak birer kesit hematoksilen eozin (H&E) ile boyandı ve lezyonlu dokular KGHV antijeninin gösterilmesi için virusa karşı hazırlanmış ticari antikolarla immunohistokimyasal olarak boyandı. Hastalığın safhası lezyonlara bakılarak akut, subakut ve kronik olarak sınıflandırıldı (41). Akut lezyonlar yangısal hücre infiltrasyonlarının olmadığı değişen derecelerdeki demyelinasyon ile karakterize idi. Subakut lezyonlarda demyelinasyonla birlikte orta derecede perivasküler hücre infiltrasyonu ve mikroglia ve astrosit proliferasyonunu içeren reaktif değişikliklerle ilişkiliydi. Kronik lezyonlar ise kalın perivasküler hücre infiltrasyonları, beyaz maddenin güve yeniği tarzındaki şiddetli demyelinasyonu ve fazla miktardaki makrofaj ile karakterize idi. Bu sınıflamadan farklı olarak demyelinasyonun şiddeti Luxol fast blue (LFB) boyama yapılan serebellum kesitlerinde toplam demyelinasyon alanının beyaz maddeye yüzde oranına bakılarak yapıldı. Demyelinasyon oranı % 5'in altı +1, % 5-20 arası +2 ve % 20'nin üzeri +3 olarak değerlendirildi. Alınan diğer kesitlere iNOS, nitrotirozin (NT) ve GFAP (Glial Fibriler Asidik Protein) ekspresyonunu göstermek için streptavidin-biotin-peroksidaz (SABP) immunohistokimya metodu uygulandı.

KGHV'nun dağılımı için değerlendirme: 1-2 adet küçük fokal alanda virus immunopozitifliği +1, 3-7 adet küçük fokal alanda virus immunopozitifliği +2 ve 8 ve üzeri fokal alanlarda ya da yaygın virus immunopozitifliği +3 olarak değerlendirildi.

GFAP, iNOS ve NT dağılımı için değerlendirme: x40 objektif büyütmede 10 adet demyelinasyon alanından immunopozitif hücre sayıldı ve toplam sayı ona bölünerek birim alandaki ortalama pozitif hücre sayıları hesaplandı. Enfekte ve sağlıklı serebellum kesitleri, akut, subakut ve kronik enfekte kesitler ve demyelinasyon şiddeti ile hücre sayıları arasındaki ilişki istatistiki olarak kıyaslandı.

İmmunohistokimya prosedürü: İmmunohistokimyasal boyamalar için kesitlerde streptavidin-biotin immunohistokimya kiti (Zymed Histostain Plus Bulk Kit, cat. no. 85-9043, San Francisco, CA) kullanıldı. Parafin kesitler önce iki kez ksilende 10'ar dakika bekletilerek parafini giderildi, sonra mutlak alkol, % 96 ve % 70'lik alkol serilerinden geçirilerek rehidre edildi. Tüm aşamalar nemli ortamda ve oda ısısında gerçekleştirildi. Yıkamalarda fosfat tamponu (pH 7.4) kullanıldı. Endojen peroksidaz aktivitesi distile sudaki % 3'lük H₂O₂ ile 5 dakika bekletilerek giderildi. Kesitler formaldehit solüsyonuna bağlı perdelenmiş antijenik yapıyı açığa çıkarmak için sitrat tamponlu (pH 6.0) antijen retrieval solüsyonu ile (Dako; cat. no. S1699, Glostrup Denmark) mikrodalga fırında 600 watt'da 25 dakika tutuldu ve soğutuldu. Spesifik olmayan antijenik bağlanmaları engellemek için % 5'lik keçi serumunda 5 dakika tutulduktan sonra

primer antikorla (KGHV, iNOS, NT ve GFAP) +4 °C'de bir gece inkübe edildi. Kesitler sekonder antikorla 20 dakika muamele edildikten sonra enzim ile 20 dakika inkübe edildi ve takiben 3 amino ethyl carbazole (AEC) kromojeni ile 10-15 dakika (mikroskop altında kromojenin reaksiyonu kontrol edilerek) muamele edildi. Kesitlerin son olarak Mayer's hematoksilen ile 1-2 dakika karşıt boyamaları yapıldı, distile su ile yıkandı ve su bazlı immun yapıştırıcı ile yapıştırıldı.

Görüntü Analizi: Demyelinasyon alanlarındaki immunopozitif hücre sayıları mikroskop kullanılarak görüntü analiz sistemi ile değerlendirildi (Bs200Pro Görüntü Analiz Sistemi, BAB software, Ankara, Türkiye). Kırk objektif büyütmede toplam 10 alan seçilerek analizleri yapıldı.

İstatistiksel Analiz: Histopatolojik inceleme sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesinde Mann-Whitney U ve one-way ANOVA testleri kullanıldı (29). Enfekte köpeklerde KGHV'nun dağılımı, demyelinasyon oranı, iNOS immunopozitif hücre sayısı, NT immunopozitif hücre sayısı ve GFAP immunopozitif hücre sayısı arasındaki ilişkiler Pearson korelasyon analizi ile incelendi. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verildi ve $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

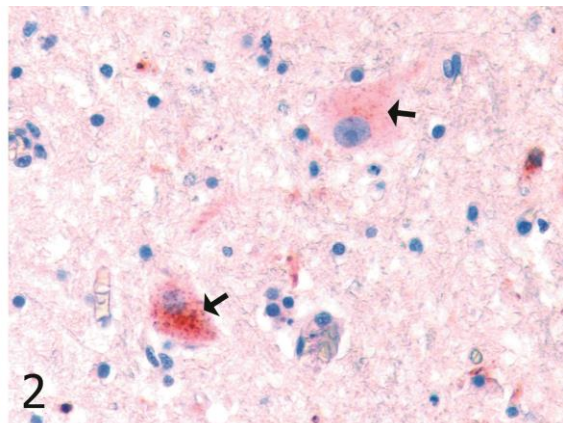
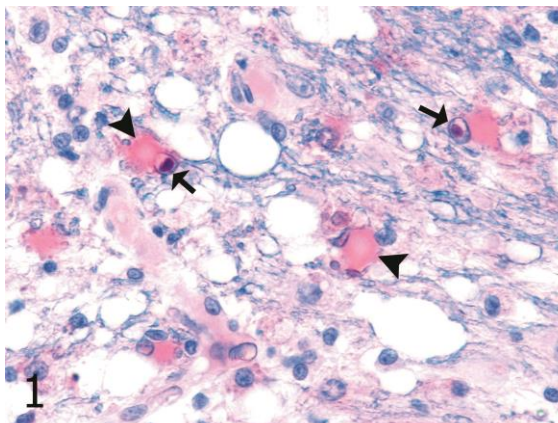
Histopatolojik bulgular: Hematoksilen eozin ile boyanan serebellum kesitlerindeki lezyonlara bakılarak 14 olgunun akut diğer 9 olgunun ise kronik safhada olduğu saptandı. KGHV ile enfekte köpeklerin serebellumlarında küçük sınırlı odaklardan, yaygın güve yeniği tarzına kadar değişen derecelerde demyelinasyon alanlarına rastlandı. İntranükleer ve intrasitoplazmik inklüzyon cisimcikleri sıklıkla gözlemlendi. Demyelinasyon alanlarında

astrositozis, astrogliozis ve mikroglial hücre proliferasyonları yanında gemistositik astrositler, gitter hücreleri ve sinsityal hücrelere de rastlandı. Kronik lezyonlarda belirgin olarak perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonları bulunmaktaydı.

KGHV için immunohistokimya sonuçları: Kontrol grubunun beyinleri KGHV antijeni için negatifti. KGHV ile enfekte serebellumlarda viral antijen diffuz ya da multifokal dağılım göstermekteydi. KGHV immunoreaktivitesine beyaz maddedeki özellikle astrositlerde (Şekil 1) ve daha az olarak nöronlar (Şekil 2) yanında mikroglialar ve subependimal hücrelerin sitoplazmalarında rastlandı. Viral antijenin dağılımına göre yapılan değerlendirmede 7 köpekte +1 düzeyinde, 9 köpekte +2 düzeyinde ve 7 köpekte +3 düzeyinde olduğu belirlendi.

Luxol fast blue boyama sonuçları: Demyelinasyonun varlığı luxol fast blue boyama ile kontrol edildi. Myelinasyona ilişkin olarak kontrol köpeklerin serebellumlarındaki boyamalarda beyaz maddenin koyu mavi renkte ve homojen boyandığı gözlemlendi. Demyelinasyon alanlarında ise koyu mavi boyanmaların myelin kaybının şiddetine göre açıldığı ve yer yer tamamen kaybolduğu görüldü (Şekil 3). Bazı alanlarda Gitter hücrelerinin sitoplazmalarında Luxol fast blue pozitif material dikkati çekti. Bu boyama sonuçlarına göre 7 köpeğin serebellumunda hafif (+1), 9 köpeğinkinde orta (+2) ve 7 köpeğinkinde şiddetli (+3) düzeyde demyelinasyon şekillendiği belirlendi.

GFAP için immunohistokimya sonuçları: GFAP immunoreaktivitesi astrositlerde sitoplazmik boyanma şeklinde görüldü. GFAP boyanması kontrol kesitlerde astrositlerin çekirdeğin etrafında belli belirsiz olan sitoplazma alanına sınırlı iken, enfekte hayvanlara ait kesitlerde özellikle oldukça bol sitoplazmaya sahip gemistositik

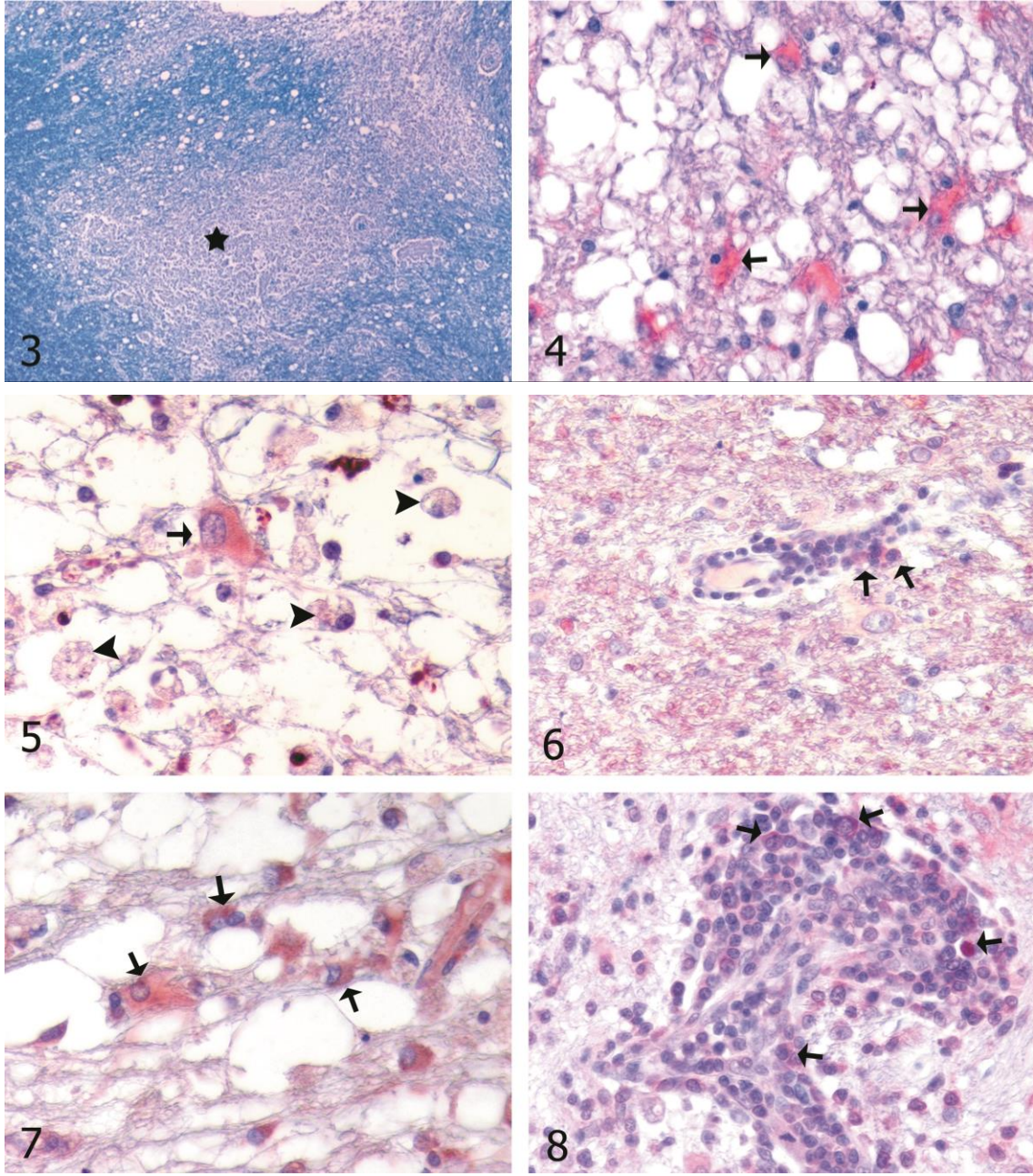


Şekil 1. Serebellumun beyaz maddesinde Köpek Gençlik Hastalığına ilişkin viral antijen immunopozitifliği (ok başları) ve bunlardan bazılarında intranükleer inklüzyon cisimciklerindeki immunopozitiflik (oklar), SABP-AEC, x360.

Figure 1. Canine distemper virus (CDV) antigen immunoreactive cells (arrow heads) and intranuclear inclusion body (arrows) in white matter of the cerebellum, SABP-AEC, x360.

Şekil 2. Köpek Gençlik Hastalığına ilişkin serebellumdaki nöronların sitoplazmasında viral antijenin immunopozitifliği (oklar), SABP-AEC, x180.

Figure 2. CDV antigen immunoreactive neuron cytoplasm (arrows) in the cerebellum x180. SABP-AEC, x180.



Şekil 3. KGHV ile enfekte serebellumun beyaz maddesinde demyelinasyon alanı (asteriks). LFB, x180.

Figure 3. Moderate demyelination area (asterix) in white matter of infected cerebellum. LFB, x180.

Şekil 4. Serebellumların beyaz maddesinde demyelinasyon alanlarında GFAP immunopozitif astroglial hücreler (oklar). SABP-AEC, x180.

Figure 4. GFAP immunopositive astroglial cells (arrows) in demyelination area of white matter of the cerebellum. SABP-AEC, x180.

Şekil 5. Serebellumun beyaz maddesindeki demyelinasyon alanlarında iNOS immunopozitif glial hücreler (tipik reaktif astrosit morfolojisine sahip) (oklar) ve iNOS immunonegatif Gitter hücreleri (ok başları). SABP-AEC, x360.

Figure 5. iNOS immunopositive glial cells (typical morphology of reactive astrocytes) (arrows) and iNOS immunonegative Gitter Cells (arrow heads) in demyelinating area of white matter of the cerebellum. SABP-AEC, x360.

Şekil 6. KGHV ile enfekte köpeklerin serebellumunun beyaz maddesindeki perivasküler mononükleer hücrelerden bazılarında iNOS immunopozitifliği (oklar). SABP-AEC, x180.

Figure 6. iNOS immunopositivity in some perivascular phagocytes (arrows) in the cerebellar white matter of a CDV infected dog. SABP-AEC, x180.

Şekil 7. KGHV ile enfekte köpeklerin serebellumunun beyaz maddesindeki glial hücrelerde (tipik reaktif astrosit morfolojisine sahip) NT immunopozitifliği (oklar). SABP-AEC, x180.

Figure 7. NT immunopositivity in glial cells (typical morphology of reactive astrocytes) (arrows) the cerebellar white matter of a CDV infected dog. SABP-AEC, x180.

Şekil 8. KGHV ile enfekte köpeklerin serebellumunun beyaz maddesindeki perivasküler fagositik hücrelerden bazılarının sitoplazmalarında NT immunopozitifliği (oklar). SABP-AEC, x180.

Figure 8. Cytoplasmic NT immunopositivity in some perivascular phagocytes (arrows) of the cerebellar white matter of a CDV infected dog. SABP-AEC, x180.

astrosit sitoplazmalarındaydı (Şekil 4). Bu reaktivite demyelinasyonun şiddeti ile ters orantılıydı.

iNOS için immunohistokimya sonuçları: iNOS immunoreaktivitesi kontrol köpeklerde gözlenmezken, KGHV ile enfekte köpeklerin beyaz maddesindeki demyelinasyon alanlarında yer alan gemistositik (reaktif) astrositlerde (Şekil 5) ve az sayıdaki perivasküler mononükleer yangı hücrelerinde (Şekil 6) pozitifliği. iNOS immunoreaktivitesinin özellikle intranükleer inklüzyon cisimciklerinin görüldüğü astrositlerde pozitif olduğu gözlemlendi. Mikroglial kökenli Gitter hücreleri iNOS yönünden immunohistokimyasal olarak immunonegatifli.

NT için immunohistokimya sonuçları: iNOS için immunopozitif gemistositik astrositler NO türevi olan peroksinitrit ve nitritin protein nitrasyonunu yansıtan NT için de immunopozitifliği (Şekil 7 ve 8). iNOS sunulduğunda olduğu gibi gemistositik astrositlerin çoğunda ve perivasküler mononükleer hücrelerin bazılarında sitoplazmik NT immunopozitifliği gözlenirken, mikroglial kökenli Gitter hücreleri immunonegatifli.

İstatistik sonuçları: Akut ve kronik enfekte grupların iNOS immunopozitif hücre sayıları ve NT immunopozitif hücre sayılarına ilişkin istatistiksel değerlendirme

Mann-Whitney *U* testi ile yapılmış olup (Tablo 1) hem iNOS ve hem de NT immunopozitifliği yönünden akut ve kronik dönem arasında $p<0.001$ oranında farklılık olduğu belirlendi.

Enfekte köpeklerde KGHV'nun dağılım oranı, demyelinasyon oranı, iNOS immunopozitif hücre sayıları, NT immunopozitif hücre sayıları ve GFAP immunopozitif hücre sayıları arasındaki ilişkiler Tablo 2'de sunuldu. Pearson korelasyon testine göre KGHV ile demyelinasyon oranı arasında, iNOS ile NT immunopozitif hücre sayıları oranı arasında $p<0.01$ düzeyinde ve demyelinasyon oranı ile iNOS immunopozitif hücre sayıları oranı arasında $p<0.05$ düzeyinde pozitif bir ilişkinin olduğu anlaşıldı (Tablo 3).

Tartışma ve Sonuç

Demyelinizan ensefalitis şekillendiren KGHV enfeksiyonu, MS gibi etiyojisi bilinmeyen diğer demyelinizan hastalıkların patogenezi için uygun bir modeldir (6). KGHV enfeksiyonunda belirgin bir astrositozis ve sınırlı bir astrogliazis olduğu belirtilmektedir (2, 26). Mutinelli ve ark. (28), demyelinasyon alanlarındaki astrositlerdeki virus varlığının aşırı olduğunu, astrositle-

Tablo 1. İmmunohistokimyasal testlerde kullanılan primer antikorlar.
Table 1. Primary antibodies used for immunohistochemical tests.

Antikor	Antikor türü	Antikor konağı	Antijen geri alma yöntemi	Kullanılan dilüsyon	İnkübasyon süresi	Üretici firma
CDV	Monoklonal	Fare	Sitrat tamponlu solüsyonda 600watt 15 dk	1/256	4°C bir gece ve 21°C 30 dk	Serotec, Birleşik Krallık
iNOS	Monoklonal	Fare	Sitrat tamponlu solüsyonda 600watt 15 dk	1/64	4°C bir gece ve 21°C 30 dk	Abcam, ABD
NT	Monoklonal	Fare	Sitrat tamponlu solüsyonda 600watt 15 dk	1/256	4°C bir gece ve 21°C 30 dk	Millipore, Kanada
GFAP	Poliklonal	Tavşan	Sitrat tamponlu solüsyonda 600watt 15 dk	1/512	4°C bir gece ve 21°C 30 dk	Abcam, ABD

Tablo 2. KGHV ile akut ve kronik enfekte grupların iNOS ve NT immunopozitif hücre sayıları.
Table 2. iNOS and NT immunopositive cell counts in acute and chronic CDV infected groups.

	KGHV ile akut enfekte	KGHV ile kronik enfekte
iNOS	7.00±1.03**	17.39±3.10
NT	8.85±2.00*	21.51±4.75

** $p<0.001$; * $p<0.01$ (Mann-Whitney *U* test).

Tablo 3. Enfekte köpeklerde KGHV immunopozitifliği, demyelinasyon oranı, iNOS, NT ve GFAP immunopozitif hücre sayıları arasındaki korelasyon. ** $p<0.01$; * $p<0.05$ (Pearson korelasyon).
Table 3. The correlations of CDV immunopositivity, demyelination ratio, iNOS, NT and GFAP immunopositive cell counts in infected dogs. ** $p<0.01$; * $p<0.05$ (Pearson correlation).

	KGHV immunopozitifliği	Demyelinasyon oranı	iNOS	NT	GFAP
KGHV immunopozitifliği	1.00	0.536**	0.333	0.191	0.003
Demyelinasyon oranı	0.536**	1.00	0.429*	0.354	-0.233
iNOS	0.333	0.429*	1.00	0.658**	0.142
NT	0.191	0.354	0.658**	1.00	0.295
GFAP	0.003	-0.233	0.142	0.295	1.00

rin KGHV için hedef hücreler olduğunu rapor etmişlerdir. Literatür bulguları ile uyumlu olarak bu çalışmada da özellikle astrositlerde olmak üzere glial hücrelerde ve nöronlarda immunohistokimyasal olarak viral antijene rastlandı. KGHV enfeksiyonunda MSS'deki astrositik yanıtı bağlı olarak GFAP immunoreaktivitesinde artış olmaktadır (28, 11, 18). Bu çalışmada, astrositoza ilişkin GFAP immunoreaktivitesinde artış belirlenmiş olup, demyelinasyon oranı ile GFAP immunopozitif hücre sayılarının oranı arasında negatif bir korelasyon olduğu fakat istatistiki olarak anlamlı olmadığı saptandı. GFAP immunopozitif hücre sayılarının oranı ile demyelinasyon arasındaki negatif korelasyonun muhtemel nedeni GFAP immunopozitif astrositlerin myelinasyonda rol oynayan bazı nörosteroidleri sentezlemeleridir (46, 47). Astrosit sayısındaki azalmaya bağlı muhtemelen myelinasyonda rolü olan maddelerin miktarlarında azalma olacak ve myelin kayıpları şekillenebilecektir.

NO'nin nöropatolojik süreçte, Alzheimer hastalığında ve serebral iskemide rol oynadığı rapor edilmiştir (1, 15). MSS'de myelin ve oligodendrosit hasarında potansiyel önemli mekanizmalardan biri aktive olmuş hücreler tarafından NO üretimidir. NO üreten hücrelerin aktif MS plaklarının çevresinde bol miktarda bulunan hipertrofik astrositler olduğu öne sürülmektedir (3, 43). Oligodendrositler NO'ye duyarlı olup kronik MS plaklarında oligodendrosit kaybı görülmektedir (23, 24).

MSS'nin nöronları etkileyen toksik hasarlarında (7), hipoksik/iskemik beyin hasarlarında (4, 14), otoimmün bozukluklarda (33), Theiler's murine encephalomyelitis virus enfeksiyonunda (31) ve keçilerdeki doğal listeriozis olgularında (35) iNOS ekspresyonunun arttığı rapor edilmiştir. iNOS'un beyin hücreleri aktive olmadıkça ekspresyonunun olmadığı bilinmektedir (20, 27). Ju ve ark. (16), skrapie ile enfekte fare beyinlerindeki reaktif astrositlerde iNOS immunoreaktivitesinin bulunduğunu ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada da demyelinasyon alanlarında gemistositik astrosit olarak tanımlanan reaktif astrositlerin bulunduğu ve bu hücrelerde iNOS immunoreaktivitesinin yoğun olduğu belirlendi. Bunun yanında, KGHV ile kronik enfekte köpeklerin serebellumlarında iNOS immunoreaktivitesinin akut enfekte köpeklerinkilerle kıyaslandığında artmış olduğu görüldü. Literatürle uyumlu olarak özellikle KGHV'nin kronik döneminde artan iNOS miktarının özellikle oligodendrositler olmak üzere diğer hücrelerdeki sitotoksik etkisi ile demyelinasyonun şekillenebileceği düşünülebilir. Çalışmamızın bulguları demyelinasyon şiddeti ile iNOS pozitif hücre sayıları arasında pozitif korelasyon olduğunu gösterdi. MSS'de demyelinasyona ilişkin yangının uyarılmasında iNOS'un rolü, iNOS eksikliği oluşturulan mutant farelerde lokal yangının baskılanması ile gösterilmiştir (42). Gerek iNOS inhibitörlerinin kullanılması yolu ile gerekse iNOS knockout mutant fareler oluşturulması yolu ile MSS yangılarında iNOS artışının engellenmesi duru-

munda demyelinasyona ilişkin klinik ve patolojik bulguların hafifletilmesi mümkün görülmektedir(31, 42).

De Groot ve ark., (8) çalışmalarında MS'li ve sağlıklı omuriliklerden hazırlanan doku kesitlerinde immunohistokimyasal olarak iNOS dağılımlarını incelemişlerdir. Araştırmacılar, aktif demyelinasyon bölgelerindeki perivasküler ve parasimal makrofajlarda yoğun iNOS immunoreaktivitesinin bulunduğunu rapor etmişlerdir. Kronik aktif lezyonların iç kısımlarında bazı rezidüel makrofajlarda zayıf iNOS pozitifliği olduğunu ve MS'li beyin ve omuriliklerde miyelinin yıkımı ve oligodendrositlerin hasarında NO üreten makrofajların önemli bir rol oynayabileceğini ifade etmişlerdir. Deneysel otoimmün ensefalitiste beyin lezyonlarında iNOS immunoreaktivitesinin özellikle perivasküler makrofajlarda ve bölgedeki bazı astrositlerde gözlemlendiği bildirilmiştir (19). Doğal listerial ensefalitisli keçi beyinlerinde özellikle mikroapse alanlarında çoğunluğunu makrofajların oluşturduğu yangısal hücrelerde ve mikroapselerin çevresindeki bazı astrositlerde iNOS immunoreaktivitesi saptanmıştır (35). Shin ve ark. (34), *Listeria monocytogenes* ile doğal olarak enfekte sığır beyinlerinde iNOS immunoreaktivitesinin özellikle perivasküler ve mikroapse alanlarındaki makrofajlarda ve bazı astrositlerde gözlemlendiğini fakat nötrofil lökositlerde gözlenmediğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda ise benzer şekilde reaktif astrositlerde iNOS immunopozitifliği gözlenirken bu çalışmada belirtildiğinin aksine makrofaj özelliği gösteren reaktif mikrogial hücrelerde (Gitter hücreleri) iNOS immunonegatifliği belirlendi. Bu bulgular, KGHV ile şekillenen demyelinasyonda MS'ten farklı olarak makrofajların değil astrositlerin etkin rol oynadığını göstermektedir.

NO'nin reaktif glial skar oluşumu ile demyelinasyon plaklarının tipik olarak görüldüğü MS'de yer alan birkaç patolojik durumun gelişiminde rol aldığı rapor edilmiştir (36). Demyelinasyon, kronik yangısal süreçle ilişkili olarak gelişen T lenfosit infiltrasyonu, hematojen kökenli makrofajlar ve lokal mikrogial aktivasyona bağlı gelişir. Yangısal süreç daha geniş aktif lezyonların olduğu kan-beyin bariyerinin bozuklukları ile ilişkilidir fakat kronik plaklarda daha sınırlı seviyede kalır. Plaklar içindeki asıl yapısal hasar aksonların yapısının korunduğu primer demyelinasyondur. Bununla birlikte bu terim kısmen doğrudur çünkü tüm olgularda farklı lezyonlarda değişen derecelerde akson kaybı olur. NO bu süreçlerin her birinde rol oynayabilir çünkü kan-beyin bariyerinin permeabilitesi yanında yangısal sürecin kontrolü ve başlamasında direkt etkiye sahiptir. NO oligodendrosit hasarı ve aksonların fonksiyonel ve yapısal hasarına bağlı olarak demyelinasyonda da bir role sahip olabilir. Bu çalışmada akut döneme göre kronik dönemde iNOS ekspresyonunun astrositlerde istatistiki olarak artmış olduğu gözlemlendi. Bu artış akut dönemde viral etki ile başlamış olduğu belirtilen demyelinasyonun kronik dönemde NO etkisi ile devam etmiş olabileceği tezini desteklemektedir.

Myelin hasarının belirteci olarak görülen NT, MS plaklarındaki iNOS ile ilişkili olduğu ve bunun peroksinitritten kaynaklanan hasarın indeksi olduğu ileri sürülmüştür (13). Araştırmacılar üç önemli gözlemde bulunmuşlardır; ilki nitrotirozinin kronik aktif plaklardaki yoğun iNOS boyanma bölgelerine komşu bölgelerdeki dokular da tespit edilmiştir. İkincisi kronik aktif plaklarda iNOS yoğun bölgeler lipid ilişkili nitrotirozin pozitif materyali sindirmiş hücrelerin varlığıdır. Üçüncüsü ise nitrotirozinin beyindeki kan damarlarının iNOS pozitif damar düz kas hücrelerinin bazılarında gözlenmesidir. Bu bulgular, MS'in patogenezinde iNOS'un merkezi rolünü desteklemektedir. Cross ve ark. (5), deneysel otoimmün ensefalitis oluşturdukları farelerin omuriliğinde immunohistokimyasal olarak NT ekspresyonunu incelemişlerdir. Araştırmacılar, NT immunoreaktivitesini mononükleer hücrelerde ve uydu hücrelerde gözlemişler ve yapılan ikili boyamalarda bu mononükleer hücrelerin çoğunluğunun CD4⁺ lenfositler ve çok azının da Mac-1⁺ pozitif makrofajlar olduğunu, ayrıca, perivasküler alanlarda nadiren NT pozitif polimorfonükleer hücrelerin de bulunduğunu ifade etmişlerdir. Uydu hücrelerinin tümü GFAP pozitifliği gösteren astrositler olarak belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda, iNOS ile NT arasında pozitif bir ilişkinin olduğu belirlendi ve iNOS ve NT'nin astrositlerde immunopozitif olduğu ve iNOS ve NT immunopozitif hücre sayılarının birbirine yakın olduğu gözlemlendi. Sağlıklı köpeklerin serebellumlarında iNOS ve NT immunopozitifliği gözlenmezken, KGHV ile enfekte köpeklerin serebellumlarında bu immunopozitifliğin olduğu ve immunopozitif hücre oranlarının kronik olgularda akut olgulara göre istatistiki olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi.

Bu çalışmanın bulguları, KGHV ile enfekte serebellumlarda iNOS kaynağının esas olarak reaktif astrositler olduğunu ve demyelinasyonda artan iNOS'un hücre aracılı demyelinasyonda aktif role sahip olduğu hipotezini desteklemekte ve iNOS üretiminin baskılanması ile MSS'deki demyelinasyonun klinik ve patolojik bulgularının hafifletilebileceğini düşündürmektedir. Bu araştırma, demyelinasyonun ilerlemesinin önüne geçmek ve dolayısıyla sinirsel semptomların hafifletilmesini sağlamak için NOS inhibitörlerinin kullanılmasıyla ilgili bir çalışmaya muhtemelen ışık tutacaktır. Sonuç olarak, bu bulgular sadece KGH'nin değil aynı zamanda MS gibi demyelinasyonla seyreden insanlardaki hastalıkların patogenezi ile ilgili yapılacak bilimsel araştırmalara da katkıda bulunabilecektir.

Teşekkür

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Proje Yönetim Ofisi tarafından (PYO.VET.1901.10.001) desteklenmiş olup özeti 45th European Veterinary Conference Voorjaarsdagen, 5-7 Nisan 2012, Amsterdam, Hollanda'da poster bildiri olarak sunulmuştur.

Kaynaklar

1. Adamson DC, Wildemann B, Sasaki M, Glass JD, McArthur JC, Christov VI, Dawson TM, Dawson VL (1996): *Immunologic NO synthase: elevation in severe AIDS dementia and induction by HIV-1 gp41*. Science **274**, 1917-1921.
2. Bignami A, Dahl DD (1994): *Glial Cells in the Central Nervous System and their Response to Injury*. In: *Glial Cells in the Central Nervous System*, Landes, Austin.
3. Bo L, Dawson TM, Wesselingh S, Mork S, Choi S, Kong PA, Hanley D, Trapp BD (1994): *Induction of nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brains*. Ann Neurol **36**, 778-786.
4. Buisson A, Plotkine M, Boulu RG (1992): *The neuroprotective effect of a nitric oxide inhibitor in a rat model of focal cerebral ischaemia*. Br J Pharmacol **106**, 766-767.
5. Cross AH, Manning PT, Stern MK, Misko TP (1997): *Evidence for the production of peroxynitrite in inflammatory CNS demyelination*. J Neuroimmunol **80**, 121-130.
6. Dal Canto MC, Rabinowitz SG (1982): *Experimental models of virus-induced demyelination of the central nervous system*. Ann Neurol **11**, 109-127.
7. Dawson VL, Dawson TM (1995): *Physiological and toxicological actions of nitric oxide in the central nervous system*. Adv Pharmacol **34**, 323-342.
8. De Groot CJ, Ruuls SR, Theeuwes JW, Dijkstra CD, Van der Valk P (1997): *Immunocytochemical characterization of the expression of inducible and constitutive isoforms of nitric oxide synthase in demyelinating multiple sclerosis lesions*. J Neuropathol Exp Neurol **56**, 10-20.
9. Defaux A, Zurich MG, Braissant O, Honegger P, Monnet-Tschudi F (2009): *Effects of the PPAR-beta agonist GW501516 in an in vitro model of brain inflammation and antibody-induced demyelination*. J Neuroinflammation. **7**, 15-28.
10. Grisham MB, Jourdain D, Wink DA (1999): *Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation*. Am J Physiol **276**, 315-321.
11. Headley SA, Soares IC, Graca DL (2001): *Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes in dogs infected with canine distemper virus*. J Comp Pathol **125**, 90-97.
12. Higgins RJ, Krakowka SG, Metzler A, Koestner A (1982): *Primary demyelination in experimental canine distemper virus induced encephalomyelitis in gnotobiotic dogs. Sequential immunologic and morphologic findings*. Acta Neuropathol **58**, 1-8.
13. Hilla EK, Zollinger LV, Watta HE, Carlsons NG, Rose JW (2004): *Inducible nitric oxide synthase in chronic active multiple sclerosis plaques: distribution, cellular expression and association with myelin damage*. J Neuroimmunol **151**, 171-179.
14. Iadecola C, Zhang F, Xu S, Casey R, Ross ME (1995): *Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia*. J Cereb Blood Flow Metab **15**, 378-384.
15. Iadecola C, Zhang F, Casey R, Nagayama M, Ross ME (1997): *Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene*. J Neurosci **17**, 9157-9164.
16. Ju WK, Park KJ, Choi EK, Kim J, Carp RI, Wisniewski HM, Kim YS (1998): *Expression of inducible nitric oxide synthase in the brains of scrapie-infected mice*. J Neurovirol **4**, 445-450.

17. Jungi TW, Pfister H, Sager H, Fatzer R, Vandeveld M, Zurbriggen A (1997): *Comparison of inducible nitric oxide synthase expression in the brains of Listeria monocytogenes-infected cattle, sheep, and goats and in macrophages stimulated in vitro*. Infect Immun **65**, 5279-5288.
18. Kabakci N, Yarım M, Karahan S, Guvenc T, Yagci BB, Gurcan IS (2004): *Immunohistochemical investigation of cerebellum in dogs infected with canine distemper virus*. Acta Vet Hung **52**, 327-337.
19. Kim S, Moon C, Wie MB, Kim H, Tanuma N, Matsumoto Y, Shin T (2000): *Enhanced expression of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in autoimmune encephalomyelitis*. J Vet Sci **1**, 11-17.
20. Lee SC, Dickson DW, Liu W, Brosnan CF (1993): *Induction of nitric oxide synthase activity in human astrocytes by interleukin-1 beta and interferon-gamma*. J Neuroimmunol **46**, 19-24.
21. Leon-Chavez BA, Aguilar-Alonso P, Gonzalez-Barrios JA, Eguibar JR, Ugarte A, Brambila E, Ruiz-Arguelles A, Martínez-Fong D (2006): *Increased nitric oxide levels and nitric oxide synthase isoform expression in the cerebellum of the taiep rat during its severe demyelination stage*. Brain Res **1121**, 221-230.
22. Marques CP, Cheeran MC, Palmquist JM, Hu S, Lokensgard JR (2008): *Microglia are the major cellular source of inducible nitric oxide synthase during experimental herpes encephalitis*. J Neurovirol **14**, 229-238.
23. Merrill JE, Ignarro LJ, Sherman MP, Melinek J, Lane TE (1993): *Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide*. J Immunol, **151**, 2132-2141.
24. Merrill JE, Murphy SP (1997): *Inflammatory events at the blood brain barrier: regulation of adhesion molecules, cytokines, and chemokines by reactive nitrogen and oxygen species*. Brain Behav Immun **11**, 245-263.
25. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991): *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology*. Pharmacol Rev **43**, 109-142.
26. Montgomery DL (1994): *Astrocytes: form, functions, and roles in diseases*. Vet Pathol **31**, 45-167.
27. Murphy S, Simmons ML, Agullo L, Garcia A, Feinstein DL, Galea E, Reis DJ, Minc-Golomb D, Schwartz JP (1993): *Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells*. Trends Neurosci **16**, 323-328.
28. Mutinelli F, Vandeveld M, Griot C, Richard A (1989): *Astrocytic infection in canine distemper virus-induced demyelination*. Acta Neuropathol **77**, 333-335.
29. Rao CR. *Linear statistical inference and its applications*. John&Sons. New York, 1973.
30. Raposo C, Nunes AK, Luna RL, Araújo SM, da Cruz-Höfling MA, Peixoto CA (2013): *Sildenafil (Viagra) protective effects on neuroinflammation: the role of iNOS/NO system in an inflammatory demyelination model*. Mediators Inflamm, **2013**,321460-321471.
31. Rose JW, Hill KE, Wadab Y, Kurtz CIB, Tsunoda I, Fujinami RS, Cross AH (1998): *Nitric oxide synthase inhibitor, aminoguanidine, reduces inflammation and demyelination produced by Theiler's virus infection*. J Neuroimmunol **81**, 82-89.
32. Santiago E, Pérez-Mediavilla LA, López-Moratalla N (1998): *The role of nitric oxide in the pathogenesis of multiple sclerosis*. J Physiol Biochem **54**, 229-237.
33. Shin T, Tanuma N, Kim S, Jin J, Moon C, Kim K, Kohyama K, Matsumoto Y, Hyun B (1998): *An inhibitor of inducible nitric oxide synthase ameliorates experimental autoimmune myocarditis in Lewis rats*. J Neuroimmunol **92**, 133-138.
34. Shin T, Weinstock D, Castro MD, Acland H, Walter M, Kim H, Ahn M, Purchase HG (2001): *Neuronal constitutive and inducible nitric oxide synthase expression in the brain of Listeria monocytogenes-infected cattle*. Acta Vet Brno **70**, 43-47.
35. Shin T, Weinstock D, Castro MD, Acland H, Walter M, Kim HY, Purchase HG (2000): *Immunohistochemical study of constitutive neuronal and inducible nitric oxide synthase in the central nervous system of goat with natural listeriosis*. J Vet Sci **1**, 77-80.
36. Smith KJ, Lassmann H (2002): *The role of nitric oxide in multiple sclerosis*. Lancet Neurol **1**, 232-241.
37. Summers BA, Appel MJG (1987): *Demyelination in canine distemper encephalomyelitis: an ultrastructural analysis*. J Neurocytol **16**, 871-881.
38. Tipold A, Moore P, Zurbriggen A, Burgener I, Barben G, Vandeveld M (1999): *Early T cell response in the central nervous system in canine distemper virus infection*. Acta Neuropathol **97**, 45-56.
39. Tipold A, Vandeveld M, Wittek R, Moore P, Summerfield A, Zurbriggen A (2001): *Partial protection and intrathecal invasion of CD8(+) T cells in acute canine distemper virus infection*. Vet Microbiol **83**, 189-203.
40. Vandeveld M, Zurbriggen A (2005): *Demyelination in canine distemper virus infection: a review*. Acta Neuropathol **109**, 56-68.
41. Vandeveld M, Frankhauser R, Kristensen F, Kristensen B (1981): *Immunoglobulins in demyelinating lesions in canine distemper encephalitis an immunohistological study*. Acta Neuropathol **54**, 31-41.
42. Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew FY (1995): *Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase*. Nature **375**, 408-411.
43. Wong JM, Billiar TR (1995): *Regulation and function of inducible nitric oxide synthase during sepsis and acute inflammation*. Adv Pharmacol **34**, 155-170.
44. Wünschmann A, Alldinger S, Kremmer E, Baumgartner W (1999): *Identification of CD4+ and CD8+ T cell subsets and B cells in the brain of dogs with spontaneous acute, subacute-,and chronic-demyelinating distemper encephalitis*. Vet Immunol Immunopathol **67**, 101-116.
45. Wünschmann A, Kremmer E, Baumgartner W (2000): *Phenotypical characterization of T and B cell areas in lymphoid tissues of dogs with spontaneous distemper*. Vet Immunol Immunopathol **73**, 83-98.
46. Yarım M, Kabakci N (2002): *Distribution of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the cerebellum in canine distemper virus infection*. J Comp Path **127**, 290-296.
47. Yarım M, Gulbahar MY, Guvenc T, Karahan S, Harada N, Kabak YB, Karayığit MO (2010): *Aromatase Expression in the Cerebellum of the Dog Infected with Canine Distemper Virus*. BMTW **123**, 301-306.

Geliş tarihi: 11.03.2014/ Kabul tarihi: 29.08.2014

Yazışma Adresi:

Prof. Dr. Murat Yarım
Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı, Kurupelit/Samsun
e-mail: myarım@omu.edu.tr