

Gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) enfeksiyöz pankreatik nekrozun patogenezisinde apoptozisin rolü

Nihat TOPLU¹, Harun ALBAYRAK², Ahmet AYDOĞAN¹, E. Tuğrul EPİKMEN¹, Nursal METİN¹

¹ Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye; ² Samsun Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Samsun, Türkiye.

Özet: Çalışmada, bir balık işletmesinde iştahsızlık ve yüzme bozuklukları gösteren, ortalama 5 g ağırlığında, 12 adet gökkuşığı alabalığı incelendi. Histopatolojik incelemede, pankreasta ekzokrin bezlerin ve Langerhans adacıklarının fokal ya da diffuz nekrozları görüldü. İmmunohistokimyasal incelemede; enfeksiyöz pankreatik nekroz (IPN) viral antijenleri, yoğun olarak pankreas, karaciğer, kalp ve iskelet kasları daha az olarak da, böbrek, dalak, mide, bağırsaklar ve solungaçlarda ortaya konuldu. Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) sonucunda; IPN virüsünü işaret eden yaklaşık 206 bp aralığında görüntü elde edildi. Apoptozis göstergelerinden TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling), kaspaz-3, -8 ve -9 pozitiflikleri; apoptozisin iskelet ve kalp kasında içsel ve dışsal uyarımlarla, karaciğer, dalak, böbrekler, sekonder lameller, mide, pilorik keseler ve bağırsaklarda içsel yol ile indüklendiğini göstermektedir. Buna karşın, IPN virüsü için primer hedef organ olan pankreasta apoptotik hücre ölümü, hastalığın patogenezisinde çok etkin değildi. Sonuçta; çalışma bulguları IPN'un patogenezisinde apoptotik hücre ölüm mekanizmasının virüsün lehine olduğunu göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Apoptozis, gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), IPN, immunohistokimya, RT-PCR.

Role of apoptosis in pathogenesis of infectious pancreatic necrosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)

Summary: In this study, total of 12 rainbow trout (average weight 5 g) from a fish farm were examined. Clinically, the fish showed inappetite and irregular swimming. In histopathological examination, focal to diffuse acinar cell degeneration and necrosis were observed in pancreas. Immunohistochemically, IPN viral antigens appeared especially in the pancreas, liver, cardiac and skeletal muscles, and occasionally in the kidneys, spleen, stomach, intestines and gills. In Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) examination, appropriately sized product (206 bp) were amplified from tissue samples and specific signals for IPN virus were observed. Apoptosis signals TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling), caspases-3, -8 and -9 positivities) indicated that apoptosis was induced both by intrinsic and extrinsic pathways in the skeleton and cardiac muscles, whereas by only intrinsic pathway in the liver, spleen, kidneys, gills, stomach and intestines. However, signals of apoptotic cell death were not clearly detected in pathogenesis of IPN in the pancreas as the main target organ. In conclusion, our results suggest that apoptosis, a cell death mechanism, could be appeared in favor of IPN virus in pathogenesis of the disease in field conditions.

Key words: Apoptosis, IPN, immunohistochemistry, rainbow trout, RT-PCR, TUNEL.

Giriş

Enfeksiyöz Pankreatik Nekroz (IPN), değişik balık türlerinde pankreasın nekrozu ile karakterize, akut, bulaşıcı, sistemik viral bir hastalıktır. Özellikle yavru ve genç salmonid balıklarda yüksek mortalite ile seyreder. Etken, RNA grubundan Aquabirnavirüs ailesinde IPN virüsü (IPNV)'dür (4, 9,18,20).

IPN özellikle genç alabalıklarda perakut formda yüksek mortaliteye yol açar. Salmonid balıklarda mikroskopik olarak lezyonlar öncelikle pankreas ve intestinal mukozada meydana gelir. Pankreasta yaygın asiner ve Langerhans adacık hücrelerinin nekrozu ve intrasitoplazmik inklüzyon cisimcikleri göze çarpar (9, 18, 21).

Programlanmış hücre ölümü ya da hücre intiharı olarak da bilinen apoptozis; çok hücreli organizmaların organogenezisi sırasında ya da gelişimini tamamlamış canlılarda, hasar görmüş ya da potansiyel olarak tümöral yatkınlığı olan hücrelerin uzaklaştırılmasında başvurulan hem fizyolojik hem de patolojik olarak uyarılabilen bir hücre ölüm mekanizmasıdır (6, 10). Son yıllardaki araştırmalar, viral hastalıkların patogenezinde apoptotik hücre ölümünün büyük öneme sahip olduğunu göstermektedir (3, 7, 11). Viral enfeksiyonlarda, virüsler enfekte ettikleri hücrelerde kendi proteinlerini ve hatta kendi genomlarını konak hücrelere sentezleterek yeni generasyonlarını gerçekleştirirler ve bu yolla da enfeksiyon sürecinin devamlılığı sağlanır (19). Organizma da, bir

primitif antiviral mekanizma olan apoptotik hücre ölümü ile bu sürece karşı koymaya çalışır (10, 16). En bilinen yollarıyla apoptozis mitokondri aracılı içsel ya da ölüm reseptörleri aracılı dışsal uyarımlar aracılığı ile inaktif kaspazların aktive edilmesiyle uyarılır (2, 17). Hücre içi sistein aspartat-spesifik proteazlar olan kaspazlar, hücre DNA'sının internükleozomal aralıklarını kırarak apoptozisi gerçekleştirirler (1, 6). Apoptoziste dışsal yol, Fas ve TNF- α gibi ölüm reseptörlerinin kaspaz-8'i aktive etmesi ile, içsel yol ise mitokondri aracılı kaspaz-9'un aktivasyonu ile gerçekleşir. Her iki yolda, kaspaz-3 aktivasyonu ortak endonükleaz olarak dikkati çeker (15, 19). Mitokondri bağımlı içsel apoptotik yol, pro-apoptotik (bax, bad) ve anti-apoptotik bcl-2 olarak adlandırılan Bcl-2 ailesi proteinleri aracılığı ile yönlendirilir (17).

İn vitro çalışmalarda IPNV enfekte hücrelerde apoptozisin indüklendiği görülürken, in situ gerçekleştirilen deneysel bir çalışmada ise virüs için asıl hedef organ olan pankreasta ise apoptozisin şekillenmediği kaydedilmiştir (12, 13, 14). Buna karşın, apoptozisin hangi yolla ya da yollarla indüklendiğine ilişkin bir veriye rastlanmamıştır. Sunulan çalışmada, immunofloresan (İF) yöntem ve RT-PCR ile IPN tanısı gerçekleştirilen doğal enfekte alabalıklarda, patolojik bulgular ile hastalığın patogenezisinde apoptozisin rolü ve apoptotik yollar araştırılmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışmada bir balık işletmesinden gönderilmiş ortalama 5g ağırlığında, 12 adet gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) incelendi. Nekropsileri yapılan balıklara ait doku örnekleri rutin yöntemlerle takip edildi ve 5µm kalınlığında alınan kesitler Hematoksilin-Eozin (HE) ile boyandı. Seri parafin kesitlere, viral antijenin ve apoptozis göstergelerini ortaya koymak için immunohistokimyasal yöntemler uygulandı. Alınan taze doku örnekleri viroloji laboratuvarına gönderildi.

Işık mikroskobu (Olympus BX51, 10'luk oküler ve 20'lik objektif) altında incelenen pankreas lezyonların derecelendirmesi; (-): Lezyon yok; (+): 1-5 hücre grubunu içeren nekroz (hafif lezyon); (++) : 6-10 hücre grubunda şekillenen nekroz (orta şiddette lezyon); (+++): 11'den daha fazla hücre grubunda oluşan nekroz (şiddetli lezyon) olarak değerlendirildi.

İmmunohistokimya (İHK): IPN viral antijenin tespiti için İF yöntemden yararlanıldı. Bu testte primer antikör olarak koyun anti-IPN virüs poliklonal antikoru (Microtek international inc., Canada, SIPN010), sekonder antikör olarak da tavşan anti-koyun IgG- floresan izotiosiyanat (Sigma, Rehoro, Israel) konjugatı kullanıldı.

Apoptozis göstergeleri için, standart avidin-biotin peroxidase complex (ABC) metodu ilgili firmanın (DacoCytomotion, LSAB+System-HRP Denmark) öngördüğü şekilde formalin tespitli paraffin kesitlerde

yürütüldü. Fare anti-kaspaz-3, -8 ve -9 antikörleri (Santa Cruz Biotechnology Inc.), primer antikörler olarak teste yer aldı. Negatif kontrol amacıyla, IPN negatif kesitlere aynı antikörler; IPN pozitif kesitlere de normal fare serumu uygulandı.

RT- PCR: Akutik birnavirüslerin VP2 geninde 206-bp fragmenti ortaya koymak için, taze doku örnekleri üzerinde daha önce tanımlandığı gibi WB1 ve WB2 primerleri (WB1, CCGCAACTTACTTGAGATCCATTATGC; WB2,CGTCTGGTTCAGATTCCACCTGG) kullanılarak RT-PCR uygulandı (22, 23). Virüs RNA'sı Chomczynski ve Sacchi (5) tarafından bildirilen asit-guanidium-fenol-kloroform-izoamil alkol karışımı kullanılarak ekstrakte edildi. Elde edilen pellet 20 µl distile su ile sulandırıldı. cDNA sentezine başlamadan önce, RNA içindeki muhtemel sekonder yapıları ortadan kaldırmak için, 70°C'de 5 dakika ön ısıtma yapıldı. cDNA sentezi 250mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 1.25 mM random heksamer primer, 200 U Moloney murine leukemia virüs ters transkriptaz (MMLV-RT) (MBI, Fermentas, Lithuania) ve 20 U RNase inhibitör karışımı içinde 37°C'de 1 saat ve 95°C'de 5 dakikadan oluşan program süresinde inkubasyona bırakıldı. Amplifikasyon, 3 µl cDNA, 100 mM Tris-HCl (pH 9,0), 500 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 µM primerler, 0,2 mM dNTP, ve 0,5 U Taq DNA polimeraz (MBI, Fermentas, Lithuania) karışımı içinde, 94°C'de 4 dakikayı takiben, 94°C'de 30 saniye, 60°C'de 30 saniye, 72°C'de 90 saniye süren program 40 defa tekrarlandıktan sonra 72°C'de 10 dakika süren programda termal saykır (Thermo PX2,USA) inkubasyona bırakıldı. 5 µl DNA ürünü 0,5 TAE içindeki 0,5 µg ml⁻¹ etidyum bromid içeren %2 agar içinde 80 V'da 40 dakika elektroforeze tabi tutuldu. DNA bandları ultraviyole ışık altında değerlendirildi.

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) Assay: Apoptotik hücrelerde DNA kırılmalarının TUNEL yöntemle belirlenmesinde "in situ cell death detection kit" (POD, Roche Diagnostics)'den yararlanıldı. Özetle, kesitlerin parafini giderildikten ve alkol serilerinden geçirildikten sonra %3'lük H₂O₂ de 20 dakika tutuldu. Daha sonra proteinaz K (20 µg/ml; Roche) ile oda ısısında 15 dakika inkübe edildi. Fosfat bafır solüsyonunda (PBS, pH, 7,4) 3 kez 5'er dakika yıkanan kesitler, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) ve fluorescein-dUTP (29-deoxyuridine 59-triphosphate) içeren TUNEL reaksiyon karışımından 50'şer µl damlatılarak 37 C'de 1 saat nemli kamerada inkübe edildi. Reaksiyonun varlığı floresan mikroskopta onaylandıktan sonra, kesitler PBS solüsyonlarında yıkandı. Daha sonra kesitler, anti-fluorescein-POD konjugatı ile 40 dakika oda ısısında inkübe edildi ve 3 kez PBS ile yıkandı. Son olarak da, dokular %0,045 (v/v) H₂O₂ içeren % 0.08 (w/v) 3, 3-diaminobenzidine

tetrahydrochloride (DAB, Sigma) solusyonunda 5 ile 15 dakika arasında tutularak kromojenik reaksiyon gerçekleştirildi. Mayer hematoksilen ile hafif şekilde boyanan kesitler alkol serilerinde dehidre edildi ve lamelle kapatıldı. Fizyolojik düzeydeki apoptozis göstergelerini saptamak için, IPN negatif sağlıklı balık dokularında TUNEL reaksiyon aynı düzende sürdürüldü.

İF ve apoptozis analiz sonuçları: Dokulardaki İF, TUNEL, anti-kaspaz-3, -8 ve -9 sonuçları (Olympus BX51, 10'luk oküler ve 40'lik objektif)'ndaki derecelendirilmesi; 0: pozitiflik yok; 1: hafif şiddetli (%1-3 pozitif hücre); 2: orta şiddetli (%4-8 pozitif hücre); 3: şiddetli (%9'dan daha fazla pozitif hücre) olarak değerlendirildi.

IPN virüsüyle enfekte dokularda patolojik olarak indüklenen apoptozis ile sağlıklı balık dokularında fizyolojik olarak indüklenen apoptozis sonuçları arasındaki farklılığın istatistiksel önem kontrolü t-testi ile yapıldı.

Bulgular

Klinik olarak balıklarda iştahsızlık ve yüzme bozuklukları gözlemlendi. Nekropside, makroskobik bir bulguya rastlanmadı.

Histopatolojik bulgular: Mikroskobik olarak, pankreas epitel hücrelerinde nekrozlar görüldü: Ekzokrin bez yapılarının bütünlüğü kaybolmuş, epitel hücreleri şişkin ya da parçalanmış, çekirdekleri genellikle karyorektik görünümde idi. Dejenere hücrelerin sitoplazmalarında menekşe renginde bazofilik inklüzyon cisimcikleri saptandı (Şekil 1). Nekrotik alanlarda dağılmış halde infiltrat lenfositler ve yaygın kanama alanları gözlemlendi. Midede bazı epitel hücrelerinde intrasitoplazmik bazofilik inklüzyon cisimciklerine rastlandı. Solungaçlarda ödem ve sekonder lamellerde ayrılmalar ile adezyonlar belirgindi. Kalp ve iskelet kaslarında, miyositlerin şişkin ve vakuoler sitoplazmaya sahip oldukları görüldü.

RT-PCR: Pankreas, karaciğer, bağırsaklar ve kalp doku örneklerinde, akuatik *Birnavirüs* spesifik primerleri (WB1 ve WB2) kullanılarak yapılan RT-PCR sonucunda;

IPNV'ü işaret eden yaklaşık 206 bp aralığında görüntü elde edildi (Şekil 2).

IPN viral antijenlerin dokularda dağılımı: İF inceleme sonuçları Tablo 1'de özetlenmiştir. IPN viral antijenleri histolojik lezyonlarla uyumlu olarak en yoğun ve yaygın olarak pankreasın asinus epitelleri sitoplazmalarında belirlendi (Şekil 3). Viral antijenlerin, pankreas nekrozunun şiddetli olduğu alanlarda daha az dağılımda ve yoğunlukta olduğu göze çarptı. Bazı olgularda, Langerhans adacıkları hücrelerinde de pozitif reaksiyonlara rastlandı. İskelet ve kalp kasında, immunreaksiyonlar sarkolemde ve miyositlerin sitoplazmalarında görüldü. Ayrıca, kalbin endokardiyal bölgesinde endotel hücrelerinde de şiddetli pozitif reaksiyonlara rastlandı (Şekil 4). Karaciğerde, granüler görünümdeki immunreaksiyonlar epitel ve Kupffer hücrelerinin sitoplazmalarında belirlendi. Solungaçlarda, viral antijenler sekonder lamellerde görüldü. Mide, pilorik keseler ile bağırsak kript epitellerinde pozitif reaksiyonlara rastlandı. Böbreklerde, tubulus epitellerinin yanında lenfoid hücrelerde de immun reaksiyonlar görüldü.

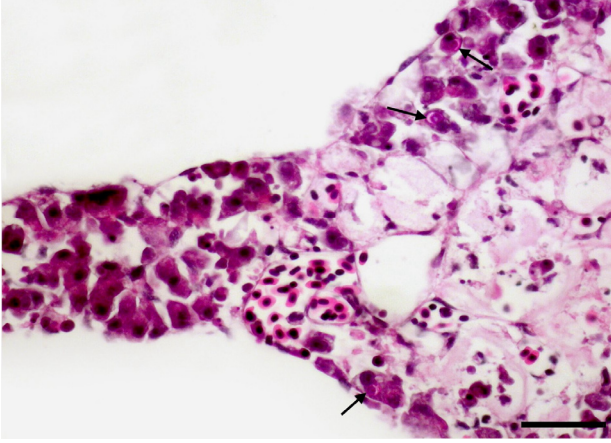
Apoptozis göstergeleri: TUNEL yöntemde, DNA kırılmalarını işaret eden reaksiyonlar özellikle karaciğer epitel hücreleri, böbrek interstisyumu ve dalakta lenfoid hücrelerin çekirdeklerinde dikkati çekti. Ender de olsa bazı olgularda, TUNEL reaksiyon diffuz ya da kaba granüler boyanmalar şeklinde hücre sitoplazmalarında da seçilmekteydi. TUNEL testte saptanan sitoplazmik reaksiyonlar ise nükleus kalıntılarını içeren apoptotik cisimciklerle ilişkilendirildi. Sekonder lameller ile iskelet ve kalp kasında miyositlerde daha az sıklıkta görülen TUNEL reaksiyona, pankreasta ise hiç rastlanılmadı. Negatif kontrol kesitlerde, TUNEL reaksiyon karaciğer dışında diğer organlarda belirgin bir artış sergilemedi. Pozitif ve negatif kontrol kesitlerde, TUNEL reaksiyon karışımı yerine terminal transferaz içermeyen solüsyonla yapılan test, bütün kesitlerde negatif sonuç verdi.

Tablo 1: İF yöntemle IPN viral antijen pozitifliğinin çeşitli dokulardaki dağılımı (n=12).

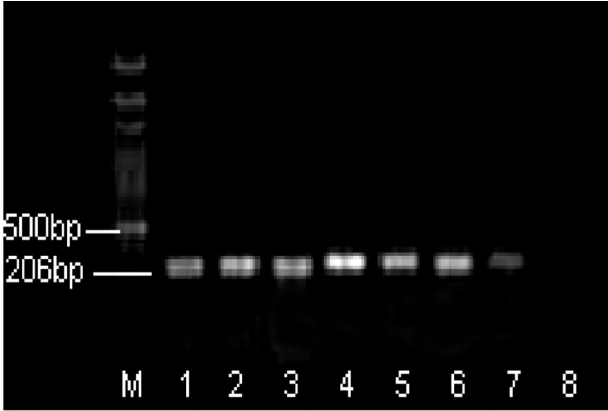
Table 1: Immunolabeling scores of IPN viral antijen with immunofluorescence method in various tissues (n=12).

Olgu no	Pankreas	Karaciğer	Böbrek	Dalak	İskelet kası	Kalp kası	Solungaçlar	Mide ve bağırsaklar
1	++	+	-	-	+	++	++	++
2	+++	++	+	-	+	+	+	+
3	+	++	++	+	++	+++	++	++
4	+++	++	+	-	-	+	+	+
5	++	+++	+	-	+	++	++	+
6	++	+++	+	+	++	+++	+	-
7	+++	++	+	+	-	-	-	-
8	++	+	-	-	+	-	+	+
9	+	++	+	-	-	+	-	-
10	+++	++	-	-	-	-	-	++
11	+++	+	+	+	++	++	++	++
12	+++	++	-	-	-	+	+	+

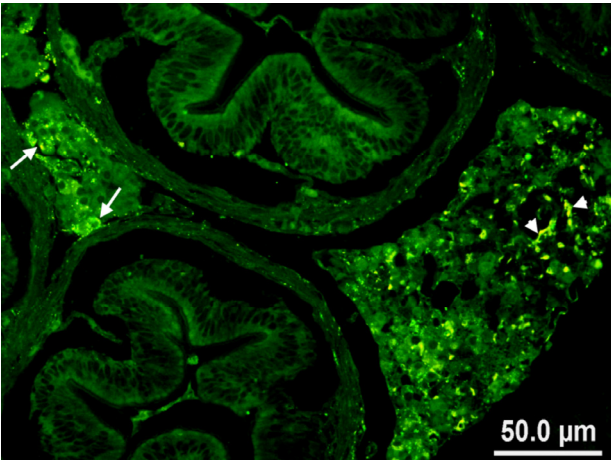
+: Zayıf ++: Orta şiddetli +++: Şiddetli



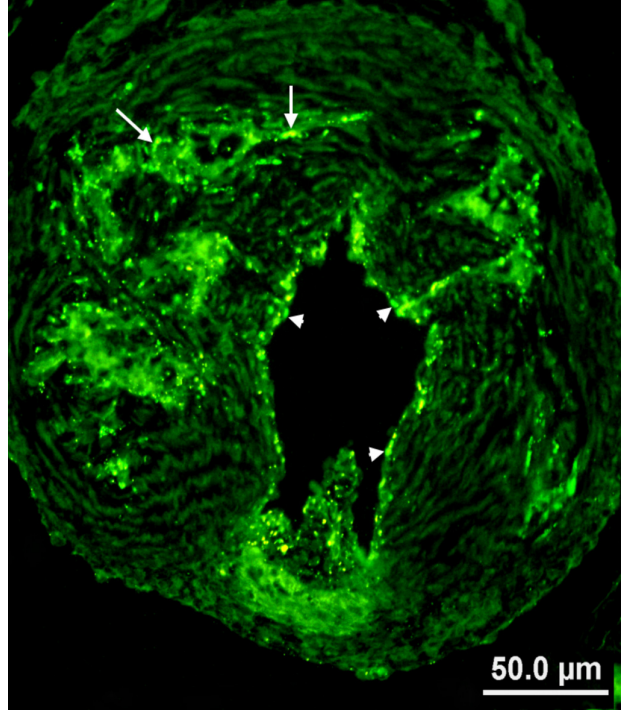
Şekil 1: Pankreas asinus bezlerinde geniş nekrotik alan ve epitel hücre sitoplazmalarında inklüzyon cisimcikleri. HE. Bar: 30µm.
Figure 1: Necrosis of exocrin glands and cytoplasmic inclusion bodies (arrows) in epithelial cells of the pancreas. HE. Bar: 30µm.



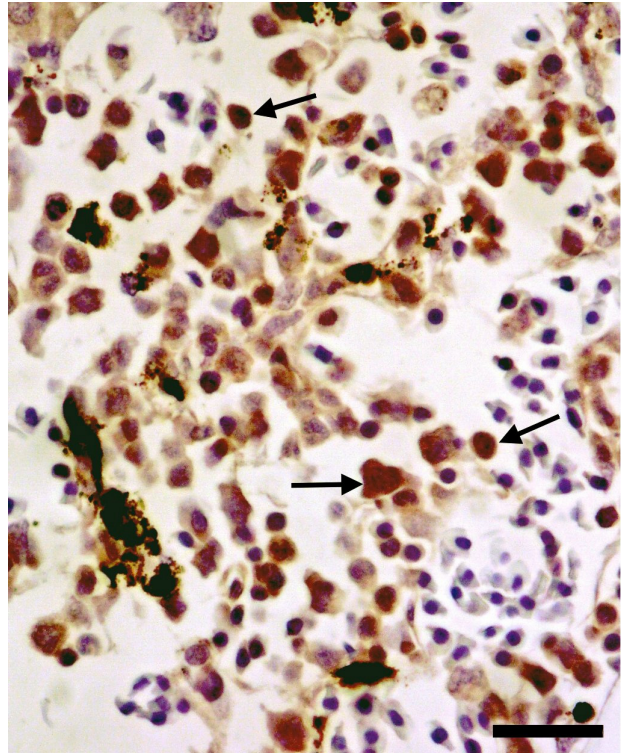
Şekil 2: Akuatik Birnavirüs spesifik primerler (WB1 ve WB2) için spesifik PCR ürünler.
M: Merdiven 1: Pozitif Kontrol 2,3,4,5,6,7: Pozitif Saha Örnekleri 8: Negatif Kontrol
Figure 2: Electrophoresis of PCR products for acuatric birnavirus specific primers WB1 and WB2.
M: Marker, Lane 1 : Positive control, Lanes: 2,3,4,5,6,7: Positive samples, Lane 8: Negative control.



Şekil 3: Pankreas asinus epitel hücre sitoplazmalarında (oklar) ve nekrotik hücre kalıntılarında (okbaşları) IPN viral antijen immunopozitif reaksiyonlar. İF metot.
Figure 3: Immunolabeling of IPN viral antijen in epithelial cells and necrotic remnants of acinar glands in the pancreas. Immunofluorescence method.



Şekil 4: Kalbin myositlerinde (oklar) ve endokart endotelilerinde (ok başları) immunopozitif reaksiyonlar. İF metot.
Figure 4: Immunopositive reactions in myocytes (arrows) and endocardial endotheliums (arrowheads) of the heart. Immunofluorescence method.



Şekil 5: Böbrekte lenfoid hücrelerinde aktif kaspaz-9 immunopozitifliği. ABC. Bar: 50µm.
Figure 5: Active caspase-9 immunopositive reactions in lymphoid cells of the kidney. ABC. Bar: 50µm.

Apoptozis göstergelerinden anahtar rol oynayan aktif kaspaz-3 immunreaksiyonu karaciğer epitel hücreleri (ortalama, %27), iskelet (ortalama, %12) ve kalp kası (ortalama, %6) miyositlerin sitoplazmalarında belirgin şekilde dikkati çekti. Sağlıklı balıkların karaciğerlerinde de TUNEL (ortalama, %6) ve kaspaz-3 reaksiyonu (ortalama, %4) kaydadeğer iken, diğer dokularda ise %1'in altında idi. IPN virüsüyle enfekte dokulardaki apoptozis sonuçları ile sağlıklı balık dokularındaki apoptozis sonuçları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık belirlendi ($p < 0,001$). Aktif kaspaz-9 immunreaksiyonu, dalak (ortalama, %24) ve böbreklerin (ortalama, %26) lenfoid hücreleri ile (Şekil 5) karaciğer epitel hücre (ortalama, %32) sitoplazmalarında belirgin şekilde göze çarparken, pankreas asinus hücreleri (ortalama, %0,8) ve sekonder lamellerde (ortalama, %3), hafif ya da orta şiddette boyanmalar şeklinde görüldü. Aktif kaspaz-8 immunreaksiyon ise yalnızca iskelet (ortalama, %5) ve kalp kası (ortalama, %3) miyositlerinde dikkati çekti.

Tartışma ve Sonuç

Önceki çalışmalarda tanımlanan pankreastaki asiner ve Langerhans adacık hücrelerinin nekrozu ve karakteristik bazofilik intrasitoplazmik inklüzyon cisimcikleri, çalışmanın olgularında da en çok göze çarpan bulgulardandı (9, 18, 21). Histolojik olarak oldukça karakteristik lezyonlar eşliğinde; dokularda viral antijenin demonstrasyonu ve akuatik *Birnavirüs* genomunun elektroforez görünümü IPNV'unun varlığını kanıtlamaktadır. IPN viral antijenler, histolojik değişikliklerle uyumlu olarak en yoğun şekilde pankreasta göze çarpmıştır. Buna karşın, pankreastaki nekrotik sahaların genişlemesi ile immunopozitif reaksiyonlarda zayıflama kaydedilmiştir. Böyle sahalarda viral antijen yoğunluğundaki azalma virüs antijenik yapısının zarar görmesiyle ilişkilendirilmiştir. İF ve RT-PCR sonuçları, virüsün, histolojik lezyonların pankreas kadar dikkat çekici olmadığı, karaciğer, kalp ve iskelet kaslarında da yoğun; solungaçlar, mide ve bağırsaklarda daha az yoğunlukta olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, IPN tanısında yalnızca pankreasın değil diğer dokuların da tanıya dahil edilmesi gerektiğine işaret etmektedir.

Viral enfeksiyon sırasında indüklenen apoptozis, bir primitif antiviral mekanizma olarak enfekte hücrelerin eliminasyonunu sağlar (10, 16). Buna karşın, virüsler de yeni generasyonlarını oluşturmak ve enfeksiyonu şekillendirmek için; ya hızlı üreyerek ya da konakçı-virüs etkileşimleri sürecinde geliştirdikleri anti-apoptotik genler aracılığı ile apoptozisi baskılamak ya da geciktirmek suretiyle primitif immun savunmaya karşılık verirler. Diğer yandan, bazı virüsler de immun hücrelerin apoptozisini indüklemek suretiyle patojenitelerini arttırmalar (19).

Eleouet ve ark. (8)'nin yavru alabalıklarda gerçekleştirdikleri deneysel IPN enfeksiyonunda, TUNEL pozitif reaksiyonları bağırsaklarda ve iskelet kaslarında kaydederken, bu çalışmada dalak ve böbreklerin lenfoid hücreleri, kalp ve iskelet kasları ile karaciğer epitel hücreleri ile kısmen solungaçların sekonder lamellerinde de belirlenmiştir. Apoptozisin içsel ve dışsal yolunda ortak bir enzim olan kaspaz-3'ün bu dokulardaki aktivasyonu, TUNEL test sonuçlarını destekler nitelikte bulunmuştur. Bu dokulardan aktif kaspaz-9 pozitifliği ve aktif kaspaz-8 negatifliği ise apoptozisin yalnızca içsel yol ile tetiklendiğini işaret etmektedir. Buna karşın, iskelet ve kalp kaslarındaki aktif kaspaz-8 pozitifliği, bu organlarda apoptozisin dışsal yol ile tetiklendiğini göstermektedir.

Balık pankreas hücre kültürlerinde gerçekleştirilen in vitro çalışmalarda IPNV'un konakçı hücrelerde apoptozisi indüklediği ve nekrozla şekillenen hücre ölümüne göre daha etkin olduğu vurgulanmıştır (12, 13, 14). Buna karşın, sunulan çalışmada, IPNV'unun asıl hedef organı olan pankreasta ise iki olgudaki (%16,6) aktif kaspaz-9 ekspresyonu dışında, TUNEL, aktif kaspaz-3 ve -8 apoptozis göstergeleri kaydedilmemiştir. Eleouet ve ark. (8), TUNEL test sonuçları da bizim verilerimizi desteklemiştir. Bu bulgular ışığında; IPN enfeksiyonunu takiben enfekte hücrelerin eliminasyonunda önemli bir mekanizma olan apoptozisin karaciğer, iskelet ve kalp kasları ile sekonder lamellerde etkin olduğu, buna karşın in vitro çalışmaların tam aksine, asıl virüs replikasyonunun gerçekleştiği pankreasta ise çok öneme sahip olmadığı görülmektedir. Pankreastaki bu uyumsuzluk, saha koşullarında in vivo ortamda konakçı-virüs etkileşiminin farklı seyirinden kaynaklandığına yorumlanmıştır. IPNV'ünün konakçı hücrenin primitif savunma sistemi olan apoptozisten nasıl kaçtığına ilişkin veriler mevcut değildir. İn vivo koşullarda IPNV pankreas hücrelerinde çok hızlı üreyerek ya da antiapoptotik kazanımlar elde ederek apoptozisten kaçma olasılığını da yadsımamak gerekir. Sonuçta, bu bulgulara dayanarak, IPNV'ünün konakçı hücrede apoptozisin indüklenmesine fırsat vermeden primitif savunma sisteminden kurtularak asiner ve Langerhans adacıklarında yeni generasyonlarını şekillendirdiğini; virüsün direkt etkisi ve enfeksiyon sırasında salgılanan olası sitotoksik sitokinlerin etkisiyle de şiddetli pankreas nekrozuna neden olduğunu işaret etmektedir.

Sunulan çalışmada dalak ve böbreklerde lenfoid hücrelerde aktif kaspaz-3 ve -9 ekspresyonları, apoptozisin içsel yol ile indüklediğini göstermektedir. Viral antijen immunopozitifliğin bu organlarda hafif dağılım sergilediği göz önünde bulundurulduğunda; apoptozisin IPN'un patogenezinde enfekte hücrelerin eliminasyonundan ziyade, konakçı immun sistemini zayıflatma yönünde rol oynadığı görülmektedir.

Sonuç olarak; doğal enfeksiyon koşullarında, apoptozisin pankreasta oluşmaması ve lenfoid dokularda indüklenmesi; IPNV'ün ağırlıklı olarak bu hücre ölüm mekanizmasını kendi lehine çevirdiğine ve patojenitesini arttırdığına yorumlanmıştır. IPN'da, apoptozis mekanizmaları ve apoptozisin hastalığın patogenezisindeki rolü hakkında daha derin öngörüler için, kapsamlı in vitro ve in vivo deneysel çalışmalara gerek vardır.

Kaynaklar

1. **Alnemri ES** (1997): *Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases*. J Cell Biochem, **64**, 33–42.
2. **Ashkenazi A, Dixit VM** (1998): *Death receptors: signaling and modulation*. Science, **281**, 1305–1308.
3. **Benedict CA, Norris PS, Ware CF** (2002): *To kill or be killed: viral evasion of apoptosis*. Nat Immunol, **3**, 1013–1018.
4. **Candan A** (2002): *First report on the diagnosis of infectious pancreatic necrosis (IPN) based on reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in Turkey*. Bull Eur Assoc Fish Pathol, **22**, 45-47.
5. **Chomyznki, P., Sacchi, N.** (1987). *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, **162**, 156-159.
6. **Cohen GM** (1997): *Caspases: the executioners of apoptosis*. Biochem J, **326**, 1–16.
7. **Dockrell DH** (2001): *Apoptotic cell death in the pathogenesis of infectious diseases*. J Infect, **42**, 227–234.
8. **Eleouet JF, Druesne N, Chilmoneczyk S, Monge D, Dorson M, Delmas B** (2001): *Comparative study of in-situ cell death induced by the viruses of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) and infectious pancreatic necrosis (IPN) in rainbow trout*. J Comp Path, **124**, 300–307.
9. **Erer H** (2002): *Balık Hastalıkları*. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya.
10. **Everett H, McFadden G** (1999): *Apoptosis: an innate immune response to virus infection*. Trends Microbiol, **7**, 160–165.
11. **Hay S, Kannourakis G** (2002): *A time to kill: viral manipulation of the cell death program*. J Gen Virol, **83**, 1547–1564.
12. **Hong JR, Lin TL, Hsu YL, Wu JL** (1998): *Apoptosis precedes necrosis of fish cell line with infectious pancreatic necrosis virus infection*. Virology, **250**, 76–84.
13. **Hong JR, Hsu YL, Wu JL** (1999): *Infectious pancreatic necrosis virus induces apoptosis due to down-regulation of survival factor MCL-1 protein expression in a fish cell line*. Virus Res, **63**, 75–83.
14. **Hong JR, Lin TL, Yang JY, Hsu YL, Wu JL** (1999): *Dynamics of nontypical apoptotic morphological changes visualized by green fluorescent protein in living cells with infectious pancreatic necrosis virus infection*. J Virol, **73**, 5056–5063.
15. **Huppertz B, Frank HG, Kaufmann P** (1999): *The apoptosis cascademorphological and immunohistochemical methods for its visualization*. Anat Embryol (Berl), **200**, 1–18.
16. **O'Brien V** (1998): *Viruses and apoptosis*. Gen Virol, **79**, 1833–1845.
17. **Reed, J. C.** (2000). *Mechanisms of apoptosis*. Am J Pathol, **157**, 1415-1430.
18. **Roberts RJ** (2001): *Fish Pathology*. 3 rd ed., W. B. Saunders, Toronto.
19. **Roulston A, Marcellus RC, Branton PE** (1999): *Viruses and apoptosis*. Annu Rev of Microbiol, **53**, 577–628.
20. **Santi N, Song H, Vakharia VN, Evensen O** (2005): *Infectious pancreatic necrosis virus VP5 is dispensable for virulence and persistence*. J Virol, **79**, 14, 9206-9216.
21. **Smail DA, Bain N, Bruno DW, King JA, Thompson F, Pendrey DJ, Morrice S, Cunningham CO** (2006): *Infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon, Salmo salar L., post-smolts in the Shetland Isles, Scotland: virus identification, histopathology, immunohistochemistry and genetic comparison with Scottish mainland isolates*. J Fish Dis, **29**, 31-41.
22. **Sweeney A, Blake S, Singer JT, Nicholson BL** (1997): *Detection and identification of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) by polymerase chain reaction (PCR)*, p. 42–47. In **Inui Y, Winton J** (ed.), *New Approaches to Viral Disease of Aquatic Animals*. National Research Institute of Aquaculture, Nansei, Japan.
23. **Williams K, Blake S, Sweeney A, Singer JT, Niholson BL** (1999): *Multiplex reverse transcriptase PCR Assay for simultaneous detection of three fish viruses*. J Clin Microbiol, 4139–4141.

Geliş tarihi: 27.04.2009 / Kabul tarihi: 29.09.2009

Yazışma adresi

Doç. Dr. Nihat Toplu
Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Patoloji Anabilim Dalı,
09016 Işıklı, Aydın.
E-posta: nihattoplu@hotmail.com