

PARVOVİRUS İLE DOĞAL ENFEKTE KÖPEKLERDE MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-9 EKSPRESYONU  
MATRIX METALLOPROTEINASE-9 EXPRESSION IN NATURAL INFECTED DOGS WITH PARVOVIRUS

Mehmet Önder KARAYİĞİT<sup>1</sup>, Özhan KARATAŞ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Sivas

**ÖZ**

Köpek parvoviral enteritis 1978 yılında ortaya çıktığından bu zamana kadar genç köpeklerde yaygın olarak görülmektedir. Sindirim yolu ile alındıktan sonra sindirim kanalında ve kemik iliğinde mitotik aktivitesi yüksek hücreleri tercih ederek şiddetli kusma, ishal, ateş, dehidrasyon ve halsizliğe sebep olur. MMP'ler embriyonik gelişim, farklılaşma, proliferasyon ve doku rejenerasyonunda önemli rol oynarlar. Bununla birlikte MMP'leri aktive ve kontrol eden faktörler arasında bir dengesizlik oluştuğunda bağırsak yangısı, artrit, ateroskleroz veya kanser dahil bir çok hastalık ile sonuçlanır. Önemli olarak, MMP-9'un ekspresyon seviyesi bağırsak yangı modellerinde ve Crohn hastalığı veya ülseratif kolit gibi yangısal bağırsak hastalıkları olan insanlarda daha yüksektir. Bu çalışmanın amacı, MMP-9'un parvovirus ile enfekte köpeklerin bağırsak enfeksiyonları üzerindeki rolünü araştırmaktır. Bu çalışmada, parvovirus ile doğal enfekte 21 köpek bağırsak dokusu MMP-9 antikoruna ile boyandı ve beş adet normal sağlıklı köpek dokusu kontrol olarak kullanıldı. Sonuç olarak parvovirus ile enfekte köpeklerin bağırsak dokularından MMP-9 ekspresyonu gerçekleşirken kontrol dokularda ekspresyon gözlenmedi. Bu sonuçlar köpeklerde parvovirüs ile oluşan enteritisin patogenezinde MMP-9 ekspresyonunun etkisinin olabileceğini işaret etmektedir.

**ABSTRACT**

Canine parvoviral enteritis has, since its emergence in 1978, been common in young dogs. After ingestion, the virus attacks rapidly dividing cells in the intestinal tract and bone marrow, causing severe vomiting, diarrhoea, fever, rapid dehydration, lethargy and decreased activity. MMPs are crucial for embryonic development, differentiation, proliferation, and regeneration of tissues. An imbalance between MMPs activating and inhibiting factors, however, results in a plethora of diseases including intestinal inflammation, arthritis, atherosclerosis or cancer. Importantly, expression levels of MMP-9 is upregulated in intestinal inflammation models and in patients suffering from human inflammatory bowel diseases such as Crohn's disease or ulcerative colitis. The aim of this study is to investigate the role of MMP-9 in the intestinal infection of dogs with parvovirus. In this study, intestinal tissues of 21 dog naturally infected with parvovirus were stained with MMP-9 antibody and five normal healthy dog tissues were used as control. As a result, MMP-9 expression from intestinal tissues of dogs with parvovirus-infected occurred while control tissues did not expression. These results indicate that MMP-9 expression might have an impact on the pathogenesis of parvovirus-induced enteritis in dogs.

**Anahtar kelimeler:** Parvoviral enteritis, MMP-9, köpek

**Keywords:** Parvoviral enteritis, MMP-9, dog

Makale Geliş Tarihi : 19.02.2018  
Makale Kabul Tarihi: 02.03.2018

**Corresponding Author:** Yrd.Doç. Mehmet Önder KARAYİĞİT,  
Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim  
Dalı SİVAS  
Tel: 0505 818 02 95  
Email: karayigit09@hotmail.com

## GİRİŞ

Köpek parvoviral enteritis genellikle 6 aylıktan küçük köpekleri etkileyen çok yaygın bir hastalıktır (1-3). Sindirim yolu ile alındıktan sonra sindirim kanalında ve kemik iliğinde mitotik aktivitesi yüksek hücreleri tercih ederek şiddetli kusma, ishal, ateş, dehidrasyon ve halsizliğe sebep olur (4). Enfekte hayvanlardaki lezyonlar bağırsak bezlerinin hemen hemen gözden kaybolması ile beraber enterositlerde yaygın nekroz ve villus atrofisi ile karakterizedir (5). Matris metalloproteinazlar (MMP) endojen metalloproteinaz doku inhibitörleri tarafından sıkı kontrol altında tutulan çinko ve kalsiyum bağımlı ekstrasellüler matris parçalayıcı endopeptidazlardan oluşur (6-8). MMP'ler kolejenazlar (MMP-1, -8, -13, -18), jelatinazlar (MMP-2, MMP-9), stromelizinler (MMP-3, -7, -11), elastazlar (12) ve membran tip (MT-MMP1-5) metalloproteinazlar olmak üzere kategorize edilebilirler (6-9). MMP'ler embriyonik gelişim, farklılaşma, proliferasyon ve doku rejenerasyonunda önemli rol oynarlar (6,7). Tipik olarak MMP ekspresyonu normal sağlıklı dokulardan çok az ya da hiç gerçekleşmez fakat hastalıklarda, doku tamiri ve onarımında veya yangılarda yoğun olarak ekspresyon gerçekleşebilir (10). MMP-9 seviyelerinin insanlarda ülseratif kolitis ve Crohn's gibi yangısal bağırsak hastalıklarında yangının olduğu bölgede arttığı bildirilmiştir (11-13). MMP'ler enfeksiyöz bağırsak yangısı ile ilişkili olarak fibroblastlar, epitel hücreleri, bazı yangısal hücrelerden salınırlar (15,16). MMP-9'un enfeksiyöz bağırsak hastalığında (16), sodyum sülfatla şekillenen kolitis (17) ve deneysel olarak oluşturulan bakteriyel kolitis (18) gibi bağırsak yangılarındaki rolü araştırılmıştır. Parvoviral enteritiste de çok şiddetli bağırsak enfeksiyonu şekillenmektedir (5). Fakat şimdiye kadar parvoviral enteritisli köpeklerin bağırsak yangısında MMP-9 ekspresyonu ilgili yapılmış herhangi bir araştırmaya henüz rastlamadık. Bu çalışmada parvo virus ile doğal enfekte köpeklerde şekillenen bağırsak yangısında MMP-9 ekspresyonun rolü araştırılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın temelini arşivden çıkarılan klinik testlerle ve histopatolojik bulgularla parvoviral enteritis teşhisi konmuş 12 dişi 9 erkek olmak üzere 21 adet köpek bağırsağından alınan doku kesitleri oluşturdu. Normal klinik semptom göstermeyen ve histopatolojik bulguları bulunmayan 5 adet sağlıklı köpek bağırsak dokusu ise negatif kontrol olarak kullanıldı. Çalışma için % 10 luk formaldehit solusyonunda tespit edilmiş ve parafine gömülmüş duodenum, jejunum ve ileum kısmından oluşan ince bağırsak bloklarından 5'er µ luk kesitler alındı ve rutin prosedür uygulanarak hematoksilen eozin (HE) ile boyandı. Avidin-biotin immun peroksidaz kompleks metod kullanılarak dokulara immunohistokimyasal (İHK) boyama yapıldı. Tüm doku kesitleri ksilende deparafinize edildikten sonra dereceli alkollerde rehidrasyonları sağlandı. Daha sonra 600 Watt da 20 dk antijen retrieval yapıldı ve takibinde kesitler 20 dk soğutulmaya bırakıldı. Endojen peroksidaz aktivitesi metanolde %3 lük hidrojen peroksit solüsyonu ile 15 dk süreyle bloklandı. Kesitler fosfat buffer salin içerisinde (PBS) 5'er dk süreyle 3 kez yıkandı. Tüm kesitler 10 dk blok solüsyonu ile muamele edildikten sonra yıkama yapılmadan üzerlerine anti-MMP-9 (1/250) antikoru

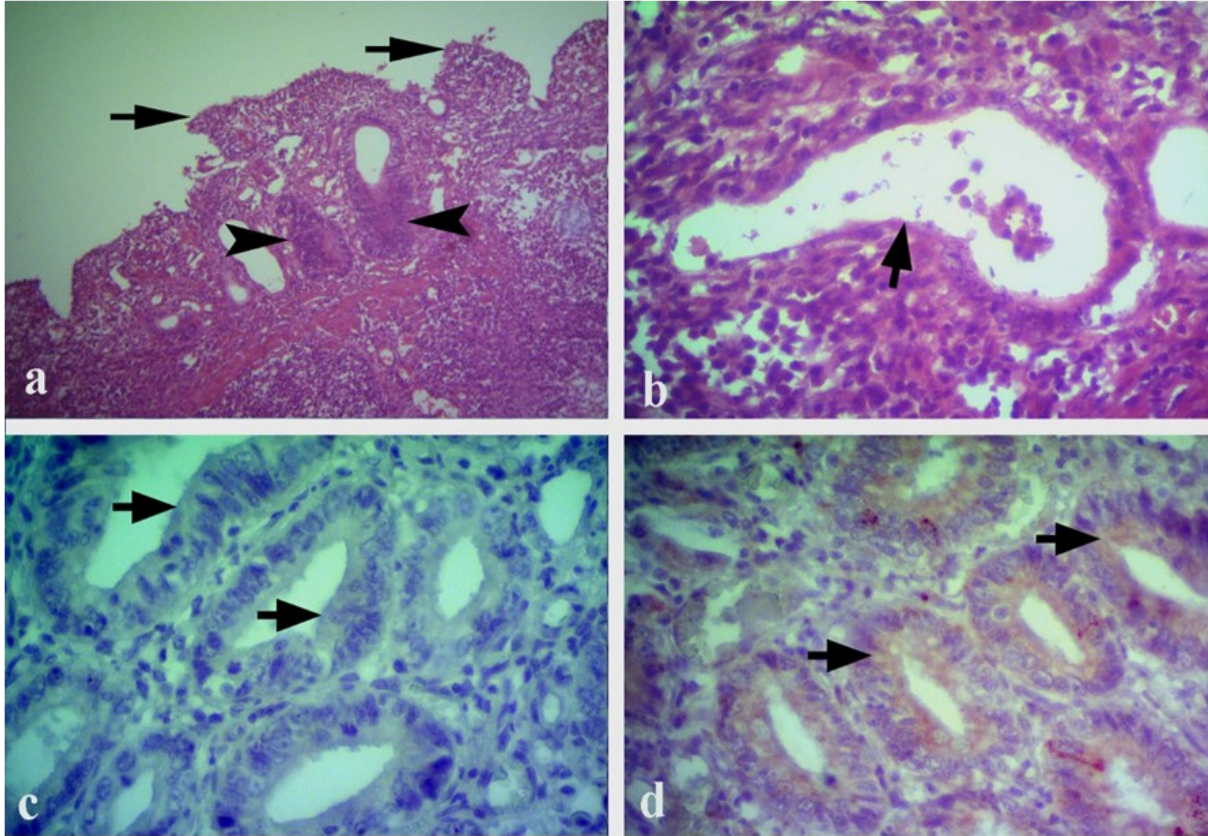
(RB-9234, Thermo-Scientific California) damlatılarak oda sıcaklığında 60 dk inkübasyona bırakıldı. Yıkamayı takiben kesitlere biotinle işaretli sekonder antikor damlatılarak 30 dk bekletildikten sonra 3 kez 5'er dk süreyle PBS ile yıkandı. Daha sonra streptavidin peroksidaz enzimi (Histostain-Plus Kits, California, USA) ile 30 dk inkübe edildi. Bu süre sonunda dokular tekrar 3 kez 5'er dk PBS ile yıkandı. Son olarak kesitler 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) (Zymed AEC RED substrat kit, ABD) kromojeni ile mikroskop altında kontrollü olarak 10 dk süreyle boyandı. Gill's hematoksilen ile karşıt boyamaları yapıldı. Su bazlı yapıştırıcı (Shandon Immu-mount) ile kesitler kapatıldı ve ışık mikroskopunda (Nikon, YS 100) incelendi.

## BULGULAR

Çalışmada klinik, histopatolojik bulgular ve klinik testlerle (One IDEXX drive,04092 USA) parvoviral enteritis teşhisi konmuş 21 adet köpek bağırsağına ait doku kesitlerine histopatolojik olarak hematoksilen eozin, immunohistokimyasal olarak ta MMP-9 antikoru ile boyamalar yapıldı. Histopatolojik olarak hemen hemen tüm hayvanlarda ince bağırsaklarda villus epitellerinde dökülme, villuslarda atrofi ve kript epitellerinde hiperplaziye rastlandı (Figür 1 a). Bağırsağın lamina propriyasında şiddetli mononükleer yangı ve peyer plaklarında boşalma ile beraber yer yer genişlemiş kriptlere rastlandı (Figür 1 b). Immunohistokimyasal boyamada negatif kontrol grubu hayvanların bağırsaklarında herhangi bir MMP-9 ekspresyonu gözlenmezken (Figür 1 c) parvovirus ile enfekte olan bağırsak dokularından 3 tanesinde sadece yangısal hücrelerden çok az ekspresyon olurken, 15 hayvanda özellikle de kript epitellerinden yoğun MMP-9 ekspresyonunun olduğu tespit edildi (Figür 1 d). 3 adet hayvanda ise kript epitellerine ilave hafif de olsa damar endotelinden ekspresyonun gerçekleştiği gözlemlendi.

## TARTIŞMA

Farelerde ve insanlarda yapılan çalışmalar MMP-9 'un enfeksiyöz bağırsak hastalığında şekillenen yangıda önemli bir rol üstlendiğini göstermektedir (14,19,20,21). Normal sağlıklı bağırsak hücrelerinden MMP-9 ekspresyonu sınırlı veya hiç gerçekleşmezken bağırsak yangılarında MMP-9 ekspresyonunun yoğun olduğu bildirilmiştir (22). *Citrobacter Rodentium* ile oluşturulan enfeksiyöz kolitisin patogeneğinde MMP-9 etkisini araştırılan çalışmanın sonuçları enfeksiyon oluşturulduktan sonra MMP-9 ekspresyonunun yoğunlaştığını göstermiş ve bağırsak yıkımının MMP-9 ekspresyonu ile yakın ilişkisi olduğu düşünülmüştür (18). MMP-9 transgenik farelerde dekstran sodyum ve *salmonella typhimurium* ile oluşturulan kolitiste sağlıklı farelerle kıyaslandığında bağırsaklardan MMP-9 ekspresyonunun çok daha yoğun olduğunu bildirmişlerdir (22). Ayrıca MMP-9 transgenik farelerde yapılan çalışmada MMP-9'un bağırsak epitel hücrelerinden aşırı artışı goblet hücre salgısının azalması ve bağırsak bariyer fonksiyonunun defekti ile ilişkilendirilmiştir. Aynı zamanda bu artışın dokudaki proliferasyon ve apoptozu da arttırdığı düşünülmüştür (22). Parvoviral enteritis parvoviruslar tarafından oluşturulan ve şiddetli bağırsak yangısıyla beraber şiddetli ishal ile karakterize güncel bir hastalıktır (5). Sunulan çalışmada kontrol grubu



**Figür 1. a)** Epiteli dökülmüş ve atrofik villuslar (oklar), kript epitellerinde hiperplazi (ok başları). HE x10.  
**b)** Genişlemiş bağırsak kript bezleri (ok). HE x40  
**c)** MMP-9 negatif sağlıklı bağırsak kript epiteli (oklar). İHK x40.  
**d)** Parvovirus ile enfekte bağırsak kript epitellerinden MMP-9 ekspresyonu (oklar). İHK x40

hayvanların bağırsağında herhangi bir hücreden MMP-9 ekspresyonu gerçekleşmezken parvoviral enteritisli köpeklerde yangısal hücrelerde ve özellikle de kript epitelleri başta olmak üzere MMP-9 ekspresyonunun yoğun olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca MMP-9 ekspresyonunda cinsiyet ayrımının olmadığı tespit edilmiştir. Çalışmada bağırsak yangısı viral bir etken tarafından oluşturulmasına rağmen daha önce deneysel olarak bakteriyel ve kimyasal yollarla oluşturulan bağırsak yangıları ile MMP-9 ilişkisini araştıran birçok makalenin sonuçları ile uyum göstermektedir (13,18,22,23). MMP-9 fonksiyonunun ve salınımının inhibitörleri (örn. Anti-inflamatuar moleküller IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  ve TIMPs) ve aktivatörleri (örn. Pro-inflamatör sitokinler IL-6, IL-1, tümör nekrozis faktör  $\alpha$ ) arasındaki bir dengesizlik doku yıkımına veya kanserojenizeye yol açmaktadır (24,25). Hem kimyasal hem de bakteri ile oluşturulan akut kolitiste MMP-9 seviyesinin artmasıyla beraber ağırlık kaybı, klinik ve histopatolojik bulguların daha kötüye gitmesiyle beraber yangı başlatıcı sitokinler olan IL-8, IL-6, IFN- $\gamma$  ve TNF  $\alpha$  seviyesinin de arttığı tespit edilmiştir (21). Bağırsak yangılarında bozulan bariyer fonksiyonu hücrelerden artan MMP-9 ekspresyonu ile ilişkili olabilir. Çalışmada histopatolojik olarak bağırsak bariyer fonksiyonunun bozulduğu ve immunohistokimyasal olarak epitel hücrelerinden yoğun olarak MMP-9 ekspresyonunun şekillendiği tespit edildi. Parvoviral enteritte bağırsakta çeşitli hücreler-

den salınan MMP-9 salınımı bağırsakta oluşan yangı ve yıkımdan sorumlu olabilir. MMP-9 salınımı sitokinlerin seviyelerini artırıp yangısal yanıt oluşturarak bölgedeki proliferasyonu da sağlıyor olabilir. Çalışmadan elde edilen MMP-9 ekspresyonuna ilişkin sonuçlar daha önceki çalışmaları desteklemekle beraber (13,18,22,23) sitokin ekspresyonun gösterilmesi patogenezi daha çok destekleyebilirdi.

Yangı başlatıcı sitokinler immun düzenleyici ajanlardır. Sitokinlerin bağırsak yangılarında düzensiz yangısal cevap şekillendirdiği bilinmesine rağmen bu mekanizma tam olarak açıklanamamaktadır. Parvovirus enfeksiyonunda bağırsakta şekillenen yangı ve doku hasarı artan MMP-9 seviyesi ile ilişkili olabilir. MMP-9 sitokin ekspresyonunda artış ile beraber yangısal yanıtı güçlendirebilir. Enteritislerin patogenezinde MMP-9 ekspresyonunun sitokinlerle olan pozitif korelasyonu bilinmektedir. Fakat parvoviral enteritisli köpeklerde şekillenen yangıda bu ilişkiyi net olarak ortaya koymak için hastalık esnasında MMP-9 ve yangısal sitokinlerin eş zamanlı salınımlarını inceleyen yeni araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

#### KAYNAKLAR

1. Decaro N, Desario C, Addie DD, et al. The study molecular epidemiology of canine parvovirus. *Europe Emerg Infect Dis* 2007;13:1222-1224.
2. Hoelzer K, Shackelton LA, Parrish CR, et al.



- Phylogenetic analysis reveals the emergence, evolution and dispersal of carnivore parvoviruses. *J Gen Virol* 2008;89:2280–2289.
3. Macintire DK, Smith-Carr S. Canine parvovirus. Part II. Clinical signs, diagnosis, and treatment. *Comp Cont Educ Prac* 1997; 19: 291-302.
  4. Turk J, Miller M, Brown T, et al. Coliform septicemia and pulmonary disease associated with canine parvoviral enteritis: 88 cases (1987-1988). *J Am Vet Med Assoc* 1990;196: 771-773.
  5. Meunier PC, Cooper BJ, Appel MJ, et al. Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: The importance of viremia. *Vet Pathol* 1985;22:60–71.
  6. Goetzl EJ, Banda MJ, Leppert D. Matrix metalloproteinases in immunity. *J Immunol* 1996;156:1–4.
  7. Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrixmetalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:207–214.
  8. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, et al. Matrixmetalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:197–250.
  9. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, et al. Matrixmetalloproteinases:biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 2000; 18:1135–1149.
  10. William CS, Carole L, Wilson S, et al. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Immunology* 2014; 4:617-629
  11. Salmela MT, MacDonald TT, Black D, et al. Upregulation of matrix metalloproteinases in a model of T cell mediated tissue injury in the intestinal: analysis by genearray and in situ hybridisation. *Intestinal* 2002; 51:540–547.
  12. Munoz M, Heimesaat MM, Danker K, et al. Interleukin (IL)-23 mediates *Toxoplasma gondii* induced immunopathology in the intestinal via matrixmetalloproteinase- 2 and IL-22 but independent of IL-17. *J Exp Med* 2009;206:3047–3059.
  13. Heimesaat MM, Dunay IR, Fuchs D, et al. The distinct roles of MMP-2 and MMP-9 in acute DSS colitis. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 2011; 1:302–310.
  14. von LB, Barthel B, Coupland SE, et al. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Intestinal* 2000; 47:63–73.
  15. Meijer MJ, Mieremet-Ooms MA, van der Zon AM, et al. Increased mucosal matrix metalloproteinase-1, -2, -3 and -9 activity in patients with inflammatory bowel disease and the relation with Crohn's disease phenotype. *Dig Liver Dis* 2007; 39:733–739.
  16. Pender SL, Li CK, Di Sabatino A, et al. Role of macrophage metalloelastase in intestinal inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1072:386–388.
  17. Santana A, Medina C, Paz-Cabrera MC, et al. Attenuation of dextran sodium sulphate induced colitis in matrix metalloproteinase-9 deficient mice. *World J Gastroenterol* 2006; 12:6464–6472.
  18. David MR, Andrew JS, Steve PH, et al. Matrix metalloproteinase 9 contributes to intestinal microbe homeostasis in a model of infectious colitis. *BMC Microbiol* 2012;12:105.
  19. Bailey CJ, Hembry RM, Alexander A, et al. Distribution of the matrix metalloproteinases stromelysin, gelatinasesA and B, and collagenase in Crohn's disease and normal intestine. *J Clin Pathol* 1994;47:113–116.
  20. Baugh MD, Perry MJ, Hollander AP, et al. Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1999; 117:814–822.
  21. Louis E, Ribbens C, Godon A, et al. Increased production ofmatrixmetalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by inflamed mucosa in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2000; 120:241–246.
  22. Hongchun L, Neal RP, Lewins W, et al. Constitutive expression of MMP9 in intestinal epithelium worsens murine acute colitis and is associated with increased levels of proinflammatory cytokine Kc. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013; 304:793–803.
  23. Marie EA, Ursula G, André F, et al. The role of gelatinases in campylobacter jejuni infection of gnotobiotic mice. *Eur J Microbiol Immunol* 2015; 4:256–267.
  24. Crawford HC, Matrisian LM. Mechanisms controlling the transcription of matrixmetalloproteinase genes in normal and neoplastic cells. *Enzyme Protein* 1996; 49:20–37.
  25. Saren P, Welgus HG, Kovanen PT. TNF-alpha and IL-1beta selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *J Immunol* 1996;157:4159–4165.