

T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
KESİN RAPORU

KÖPEK BEYİNLERİNDE YAŞA İLİŞKİN DEĞİŞİKLİKLERİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Prof.Dr.Rıfki HAZIROĞLU

2002.08.10.047

20.11.2002

20.11.2005

20.04.2006

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri

Ankara - 2006

I. Köpek Beyinlerinde Yaşa İlişkin Değişikliklerin Değerlendirilmesi

(Evaluation of the age-relating changes in dog brain)

Özet: Veteriner Patolojide yaşa ilişkin değişikliklerin incelendiği ayrıntılı çalışmalar oldukça azdır. İncelenen literatür bilgilerin büyük çoğunluğu olgu sunumlarını veya tek bir lezyonu tanımlamaktadır. Çalışma ile nöropatoloji alanında yaşın beyin üzerindeki etkilerinin genç hayvanlarla karşılaştırmalı olarak incelenmesi amaçlandı. Bu çalışmanın materyalini Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda nekropsisi yapılmak üzere kliniklerden gönderilen 20 adet 10 yaş üzeri köpek ve 10 adet 1-2 yaş arası genç kontrol köpeği oluşturdu. Beynin her üç bölümünden (telensefalon, mezensefalon, rombensefalon) alınan doku örnekleri makroskobik, mikroskobik ve immunohistokimyasal yönden incelendi. GFAP, CNPase ve β - amiloid ile pozitif boyanan hücreler ile senil plaklar, serebrovasküler amyloid angiopati, apoptotik nöronlar arasında korelasyonun bulunup bulunmadığı değerlendirildi.

Anahtar sözcükler: Yaşlanma, köpek, beyin, immunoperoksidaz

Summary: In veterinary pathology detailed researches related to age dependent alterations are rather limited. The most of literatures available consist only of case presentations or depicting only one lesion. The aim of the present study, the affects of aging on the brain was investigated and compared with young animals form neuropathological aspect. The material of the present study consisted of 20 dogs with age of 10 years over and 10 young control dogs with age of 1-2. Tissue samples taken from three different parts of the brain (telencephalon, mesencephalon, rombencephalon) were macroscopically and microscopically investigated, and immunohistochemistry was also utilised. The correlation between GFAP, β - amiloid and CNPase positive cells and senile plaques, cerebrovascular amyloidangiopathy and apoptotic neurons was evaluated.

Key words: Aging, brain, dog, immunoperoxidase.

II. Amaç ve Kapsam

Birçok hayvan türünde santral sinir sisteminde yaşa ilişkin değişiklikler tanımlanmıştır. Meninkslerde kalınlaşma, kireçlenme, damarsal değişiklikler, nöronal ve glial hücre değişiklikleri, beyaz madde dejenerasyonları pigment birikimleri, akson şişkinlikleri ve inkluzyonlar gibi değişiklikler bunlar arasında sayılabilir (1-11,15,19,20). Bununla beraber bu değişikliklerin çoğunun rastlantısal bulgular olduğu genel kabul görür, ancak fonksiyonel olarak etkilerinin tam olarak bilindiği söylenemez. Yaşlı hayvanlarda beyinde gözlenen makroskobik lezyonlar tanımlanmıştır. Beyin sulcus ve giruslarının ortadan kalkarak düzleşmesi ve ventriküllerde orta düzeyde genişlemeler (internal hidrosefalus) insanların yanı sıra köpeklerde de bilinmektedir. Ancak yaş ve ventriküler dilatasyon arasında istatistik bir ilişki de bulunamamıştır (2).

Yaşın ilerlemesi ile birlikte pek çok hayvan türünde nöron sitoplazmalarında seroid-lipofuscin pigmenti saptanmasına ve yaşlılık pigmenti denmesine karşın metabolik etkisi tam anlaşılamamıştır. Bu cisimciklerin yapısı ırklara göre farklı yapıda olup farklı yoğunlukta ve farklı santral sinir sistemi ve organ ya da hücre içi yerleşimlere sahiptir (3). Nöronlardaki bir diğer pigment birikimleri lizozomal depo hastalıklarında da gözlenmektedir (7).

Poliglukoza cisimcikleri temelde glikoz polimerlerinden oluşan inkluzyon cisimciklerini tanımlamaktadır. Genellikle yaşlı insanlarda daha az olarak da evcil hayvanlarda klinik olarak sinirsel bulgu gösteren veya göstermeyen korpora milasea, Lafora cisimcikleri, Bielschowsky cisimciği hastalığı, tip 4 glikojen depo hastalığı rastlanan poliglukoza cisimcik hastalıklarıdır (6-9,11). Bunlardan korpora amilasea ve Lafora cisimciği hastalığı yaşlı köpeklerde özellikle rapor edilen iki poliglukoza cisimciği hastalığıdır (6,9,10). Bu cisimciklerin Glial fibriler asidik protein (GFAP) ve ubiquitine'in immunoreaktif olduğu kaydedilmektedir (2,10). Astrosit hipertrofisi ve glia değişikliklerin nöroaksonal zedelenmeye karşı oluştuğu da bilinmektedir (8). Ancak son yıllarda bu reaksiyonların sadece yaşa bağlı olarak da şekillenebileceği üzerinde durulmaktadır. Serebral amiloid anjiyopati insan beyinlerinde serebral kan damarlarında amiloid birikimi ile karakterize yaşa bağlı dejeneratif bir hastalıktır. Alzheimer hastalığının histopatolojik bulgularından biridir ve benzer tablo köpeklerde de oluşmaktadır (15,20). Ubiquitine immunoreaktif granüller her yaş hayvanda tespit edilmekle beraber, yaşlı hayvanlarda belirgin artış tespit edildiği bildirilmektedir. DNA onarımında hücre döngüsünün

kontrolünde ve hücrel strese karşı cevapta fizyolojik önemi vardır. İnsanlarda ise yaşlılığın yanında Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi patolojik durumlarda da artış gözlemlendiği kaydedilmektedir (3).

Köpeklerde de gözlenen bu değişikliklerin gerçek lezyonlardan farkına ilişkin bilgiler nöropatologlar için önem taşımaktadır. Diğer taraftan klinikçiler açısından hareketlerde azalma, dikkat kaybı, uyum bozuklukları, daha önce eğitimle aldıklarını unutma gibi davranış bozuklukları yaşlı köpeklerde gözlenen bulgulardandır. Bu durumun etiolojisine ilişkin bazı önermeler olmasına karşın temel nedeni ortaya konamamıştır. Veteriner Patoloji’de yaşa ilişkin değişikliklerin incelendiği ayrıntılı çalışmalar da oldukça azdır (1-11,15,19,20) . Bu konudaki kaynakların büyük çoğunluğu olgu sunumları veya gözlenen tek lezyonu tanımlamaktadır. Bu çalışmanın amacı yaşın köpek beyinlerinde oluşturduğu değişiklikleri genç hayvanlarla karşılaştırarak incelemek ve enfeksiyöz nedenlere bağlı olarak şekillenenlerden ayırmasını ortaya koymaktır. Ayrıca insanlardaki Alzheimer ve Parkinson gibi hastalıklarla ilgili bulgularla köpeklerdeki bulguları karşılaştırmanın yanı sıra yaşlanma ile değişikliklerde köpeklerin model bir hayvan olup olamayacağını belirlemek çalışmanın ikincil amacıdır.

III. Materyal ve Yöntem

Bu çalışmanın materyalini Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalına nekropsi için kliniklerden gönderilen 20 adet 10 yaş üzeri köpek (Tablo 1) ve 10 adet 1-2 yaş arası genç kontrol köpeği (Tablo 2) oluşturdu. Beyin örnekleri makroskobik yönden değerlendirilip bulgular kaydedildikten sonra beynin temel üç bölümünden (telensefalon, mezensefalon, rombensefalon) alınan doku örnekleri %10 luk tamponlu formaldehitte tespit edilerek, alkol ve ksilol serilerinden geçirildi ve parafinde bloklandı. Mikrotom ile 8-10 mikron kalınlığında alınan kesitler hematoksilin eozin, Congo red ve Holzer, Cajal’s, Luxol Fast Blue (LFB) ile boyanarak ve ışık mikroskopunda değerlendirildi. Immunohistokimyasal inceleme için APES ile kaplı adhesiv lamlara alınan kesitlere indirekt immunoperoksidaz tekniği uygulandı. Primer serum olarak amiloid için β amiloid, senil plaklar için GFAP ve ubiquitine ve myelin için myelin basic protein, oligodendritler için CNPase, nöronlar için neuron spesifik enolase, stresin etkileri için Heat shock protein 70 kullanıldı. Immunohistokimyasal olarak boyanan kesitlerde; β amiloid, GFAP, CNPase’in boyanma yoğunlukları her kesitte rastlantısal 10 mikroskop sahasında pozitif boyanan hücreler sayılarak elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak

değerlendirildi. Çalışmada elde edilen veriler sayma ile elde edildiğinden bilinen analiz tekniklerle karşılaştırmaların tamamlanması için genelleştirilmiş doğrusal modellere analiz tekniğinde (Generalized Linear Models) tamamlandı. Buna göre: Verilerin Poisson dağılışa uygun dağıldıkları kabul edilerek verilerin modellenmesinde link (bağlantı fonksiyonu) olarak logit kullanıldı. Uyumu yapılan model: $\log it(\mu) = \frac{\mu}{(1-\mu)}$ dönüşümü yapıldıktan sonra Poisson'a uygun olarak analiz edildi. Elde edilen sonuçlarda ortalamalar arasındaki farkın belirlenmesi amacıyla ortogonal polinomlara göre grup ortalamaları karşılaştırıldı. Analizlerin tamamı SAS® (2004) istatistik paket programında PROC GENMOD prosedürü kullanılarak tamamlandı.

Köpek No	İrk	Yaş	Cinsiyet	Nekropsi Tarihi
1	Melez	10	Erkek	27.04.2001
2	Melez	14	Erkek	27.04.2001
3	Melez	20	Dişi	25.06.2001
4	Terrier	12	Erkek	07.02.2002
5	Melez	10	Erkek	15.11.2001
6	Border Coli	11	Dişi	09.10.2002
7	Pointer	16	Erkek	15.10.2002
8	Melez	12	Dişi	12.12.2002
9	Samoyed	17	Erkek	17.07.2002
10	Puanter	10	Dişi	20.03.2003
11	Pit bull	8	Dişi	23.05.2003
12	Melez	13	Dişi	04.08.2003
13	Terrier	10	Dişi	05.02.2004
14	Belçika Kurdu	11	Dişi	18.02.2004
15	Terrier	11	Erkek	06.02.2004
16	Terrier	12	Dişi	18.02.2004
17	Melez	14	Erkek	21.04.2004
18	Terrier	12	Dişi	16.09.2004
19	Terrier	15	Dişi	20.09.2004
20	Kaniş	11	Erkek	21.09.2004

Tablo 1. Çalışma grubu

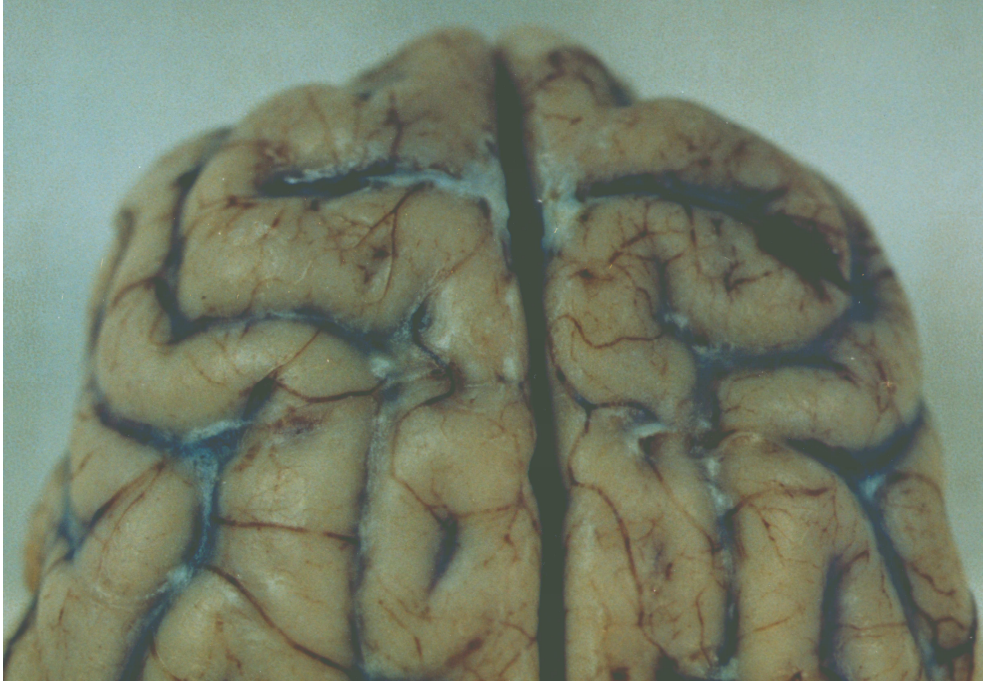
Köpek No	İrk	Yaş	Cinsiyet	Nekropsi Tarihi
K1	Husky	2	Erkek	19.10.2004
K2	Av Köpeği	1.5	Dişi	02.04.2002
K3	İngiliz Pointer	2	Dişi	14.10.2004
K4	Melez	1.5	Erkek	07.07.2003
K5	German shephard	2	Erkek	03.09.2004
K6	Melez	2	Dişi	10.09.2004
K7	Kangal	2	Erkek	01.12.2002
K8	German shephard	1	Erkek	06.03.2004
K9	Melez	1.5	Erkek	05.06.2002
K10	Melez	1	Dişi	16.06.2001

Tablo 2. Kontrol grubu

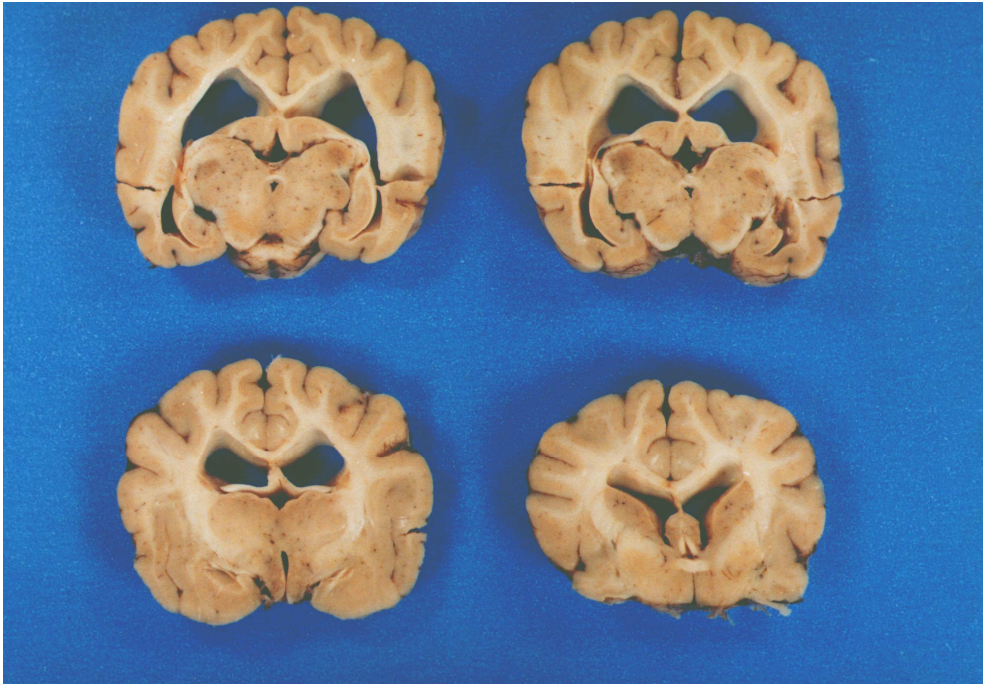
IV. Analiz ve Bulgular

a- Makroskopik Bulgular:

Kontrol olarak kullanılan geç köpeklerle karşılaştırıldığında yaşlı köpek beyinlerinde karşılaşılan makroskopik değişiklikler Tablo 3’de ayrıntılı olarak verilmiştir. Buna göre beyinde rastlanılan en yaygın makroskopik değişiklik leptomeningslerdeki kalınlaşmaydı. Kalınlaşmış olan leptomeniksler makroskopik olarak buzlu cam görünümündeydi ve yer yer boz beyaz renkte fokal kalınlaşma odakları da dikkati çekmekteydi (Şekil 1) . Yirmi adet yaşlı köpeğin 14’ünde (olgu no; 1,2,7-14,16-19) hafiften şiddetliye varan bilateral internal hidrosefalus gözlemlendi (Şekil 2). Bu olgularda ventrikuluslar ve mezensefalik kanal genişlemişti. Bir olguda şiddetli olmak üzere iki olguda (olgu no; 2 ve 13) beyin ödemi dikkati çekti. Üç olguda bazal nükleuslarda ve lobus parietalis’lerde (olgu no; 12), dördüncü ventrikulus tabanında, kornu ammonis, medulla oblongata, serebellum, meningslerde ve kapsula interna’da (olgu no; 15), ve intraventriküler (olgu no; 20) kanamalar dikkati çekti. Üç olguda (olgu no; 2,14,20) Serebellumunu hafif şiddette hipoplazik olduğu görüldü.



Şekil 1. Olgu no 1. Leptomeningitlerde yer yer boz beyaz renkli kalınlaşmalar



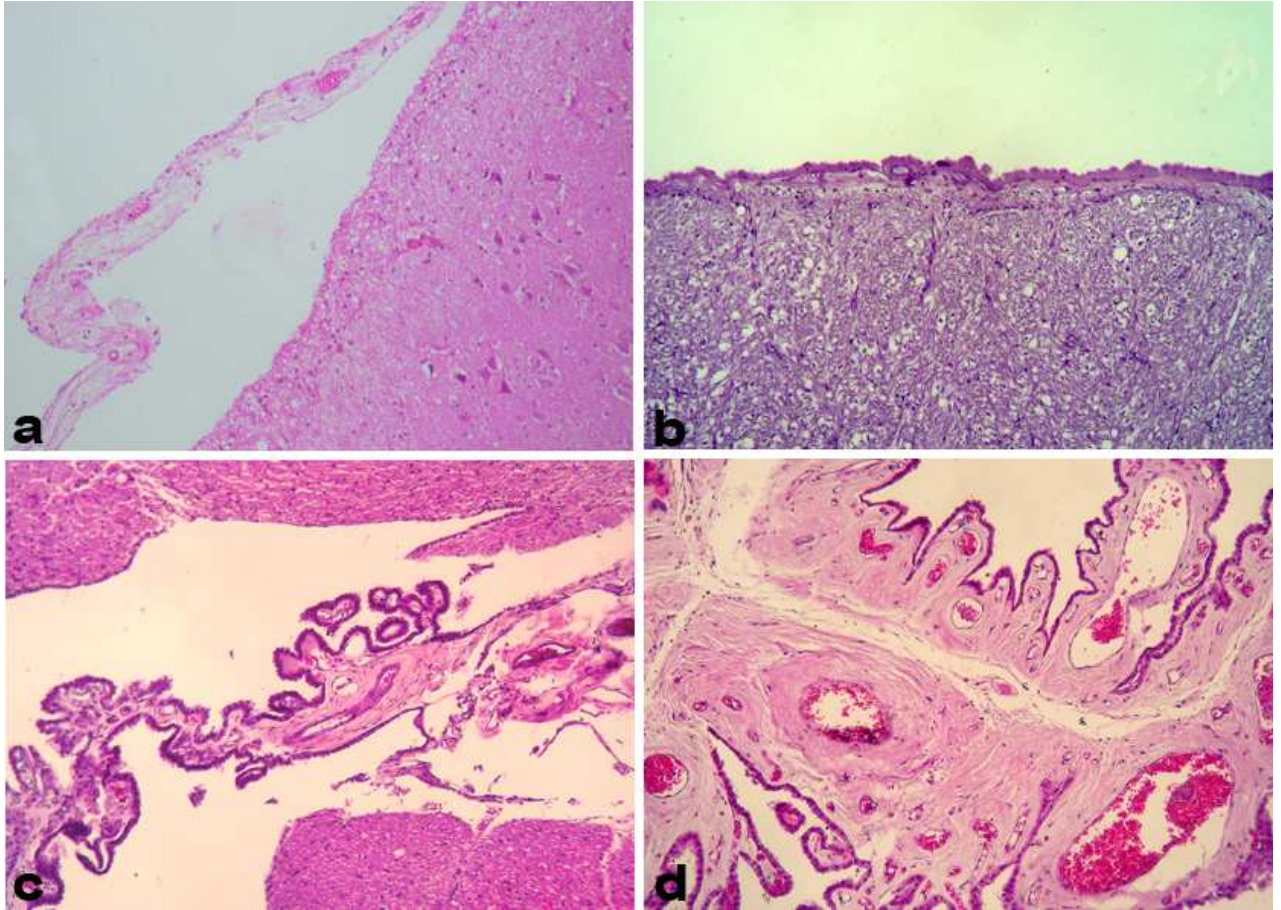
Şekil 2. Olgu no 2. Bilateral internal hidrosefalus

Lezyon	Olgu no																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Meningeal Kalınlaşma	+++	+++	+	++	++	++	+++	++	+++	-	++	++	+	++	++	+++	++	+++	+++	+++
Ventriküler genişleme	++	++	-	-	-	-	+	++	+++	++	++	++	++	++	-	+	++	+	+++	-
Serebellar hipoplazi	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Ödem	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
Kanama	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	+++	-	-	-	-	+++

Tablo 3: Yaşlı köpek beyinlerinde karşılaşılan makroskobik değişiklikler.

b- Mikroskopik Bulgular:

Histopatolojik olarak genç kontrol köpeklerle karşılaştırıldığında 20 yaşlı köpeğin 19'unda (olgu no; 1-9,11-20) meningeal fibrozis (Şekil 3a), 17 sinde de (olgu no; 2-6, 8,9,11-20) koroid pleksus'ta fibrozis dikkati çekti. Olgulara göre histopatolojik lezyonlar Tablo 4'de ayrıntılı olarak gösterildi. Leptomeningeal kalınlaşma çoğunlukla diffuz olmakla beraber makroskopik verilerle uyumlu olarak özellikle dorsal serebral hemisferlerin sulkuslarında daha belirgin fokal kalınlaşmalar şeklindeydi. Koroid pleksus'lardaki ve meninkslerdeki kalınlaşmalar çoğunlukla hyalinize bağdoku daha az olarak da fibrosit ve fibroblastlardan oluşmaktaydı (Şekil 3c ve d). Bir olguda (olgu no; 11) özellikle fokal alanlar tarzında meningeal fibrozisin bulunduğu kısımlarda hyalinize bağ dokunun kalsifikasyonu bazofilik bir görünüm kazandığı dikkati çekti (Şekil 3b).



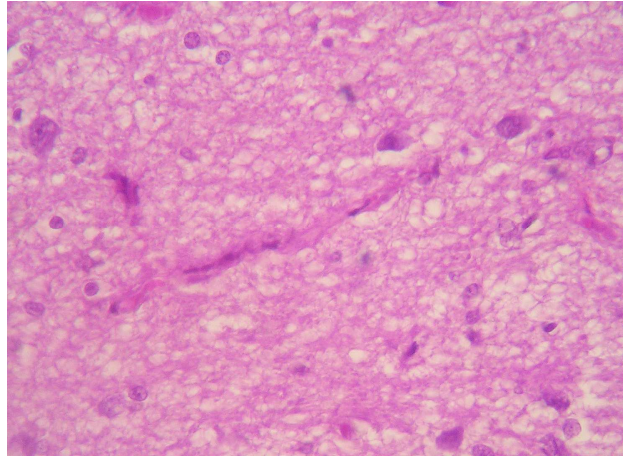
Şekil 3. a) Olgu no 16. Meningeal fibrozis, meninks, HE, X 40

b) Olgu no 11. Meninkslerde hyalinize bağ doku kalsifikasyonu, HE, 40.

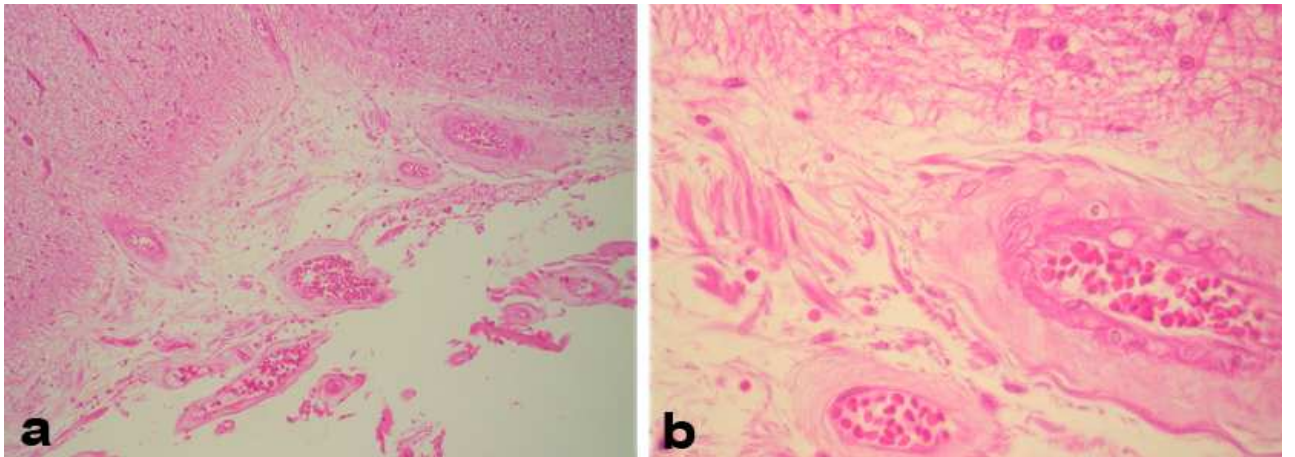
c) Olgu no 9. Koroid pleksus'larda bağ doku oluşumu ve hyalinizasyon, HE, X 40.

d) Olgu no 9. Koroid pleksus'larda hyalinizasyon, HE, X 100

Yaşlı köpeklerde en sık karşılaşılan histolojik bulgulardan diğeri de vasküler değişikliklerdi. Damar duvarlarındaki fibrozis; 13 olguda (olgu no; 1-6,9,10,13-15,19,20) hem meningeal hem de paranşimal, küçük ve orta çaplı arteriol ve venüllerde görüldü (Şekil 4). İki olgu dışında (olgu no; 1,2) bu olguların hepsinde adventisiyal fibrozise medial hyalinizasyon da eşlik etmekteydi (Şekil 5a ve b). Genç köpeklerin hiçbirinde vasküler fibrozise rastlanmadı. Meningeal ve serebral arter, arteriol ve kapilar damarlarda amiloid birikimi (olgu no; 6-9,12,16-18,20) ve senil plaklar (olgu no; 7,9,12,16,20) demonstre edildi.



Şekil 4. Olgu no. 2. Damar duvarlarında fibrozis, HE, X 400.



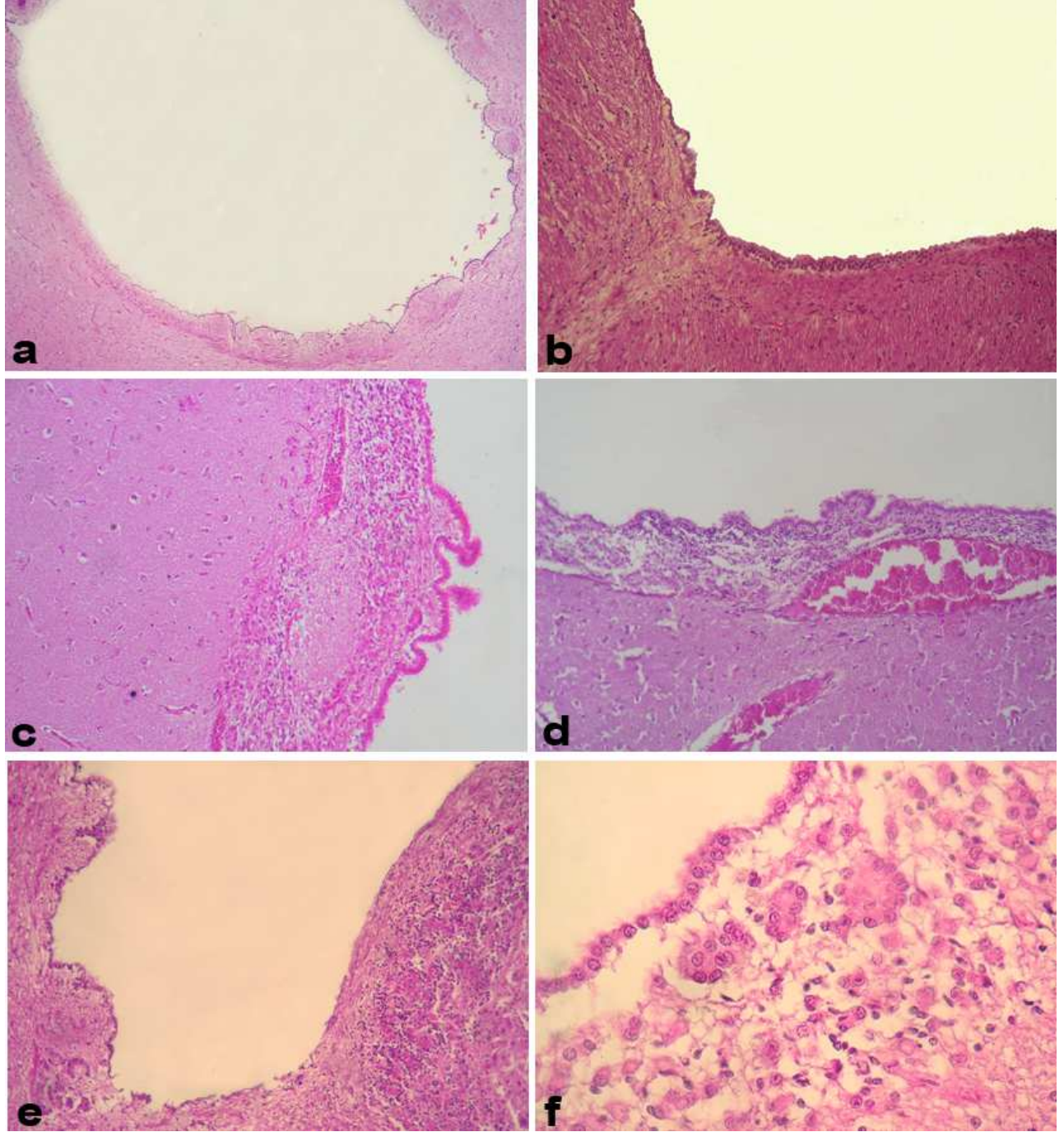
Şekil 5. a) Olgu no. 20. Damar duvarında adventisiyal fibrozis ve medial hyalinizasyon, HE, X40.

b) Olgu no. 20. Damar duvarında adventisiyal fibrozis ve medial hyalinizasyon, HE, X400.

Genç kontrol köpekleri ile karşılaştırıldığında incelenen yaşlı köpeklerin 14'ünde (olgu no; 1,2,7-14,16-19) beyin ventrikulusları ve mezensefalik kanalda genişleme göze çarptı (Şekil 6a). Beyin ventrikulusları ve mezensefalik kanalı döşeyen ependim hücreleri küboidal yapısını kaybederek yassılaştı (Şekil 6b). Mezensefalik kanaldaki ependim hücreleri ondulasyon göstermekle birlikte subependimal bölgede yer yer yangısal değişiklikler de göze çarpıyordu (olgu no; 7-13). (Şekil 6c ve d) On bir olguda (olgu no; 5-9,11-14,17,18) subependimal rozet formasyonları dikkati çekti (Şekil 6e ve f). Bazı olgularda ise (olgu no 2,7) dökülen ependim hücrelerinin yerinde sklerotik bir dokunun şekillendiği görüldü. Bir olguda III. ventrikül lumeninde homojenöz proteinli içerik dikkati çekti.

İncelenen 20 yaşlı köpeğin 8'inde (olgu no; 2,3,12,14-16,18,20) hemorajiler dikkati çekti. Perivasküler mikrohemorajiler (olgu no; 2,3,20) özellikle serebral hemisferlerde gelişigüzel dağılım göstermekteydi. Bunun yanı sıra kornu ammonis'te medulla oblongata'da ve serebellumun moleküler ve granüler hücre tabakalarında (olgu no;15) fibria vestibularis ve nukleus kuneatus'ta (olgu no 14), bazal nukleuslar ve nukleus dorsalis tegmentii'de (olgu no; 18) ve talamus'ta da (olgu no 16,20) mikrohemorajilere rastlandı (Şekil 7a ve b). Bir olguda (olgu no; 20) III ve IV ventrikulus lumenleri kanla doluydu. Bir olguda (olgu no;20) talamusta; tractus spinotektalis ve mezensefalik kanal çevresinde; tegmentum mesensefali'de infarktüs alanı ve malasik odaklar dikkati çekti.

Yaşlı köpeklerde santral sinir sisteminde rastlanan en genel bulgulardan birisi serebral korteks nöronlarında sayısal azalma, büzüşme ve gri maddedeki aksonlarda aksonal şişkinlik buna karşın nöroglialardaki sayısal artış şeklindeydi (Şekil 7c ve d).

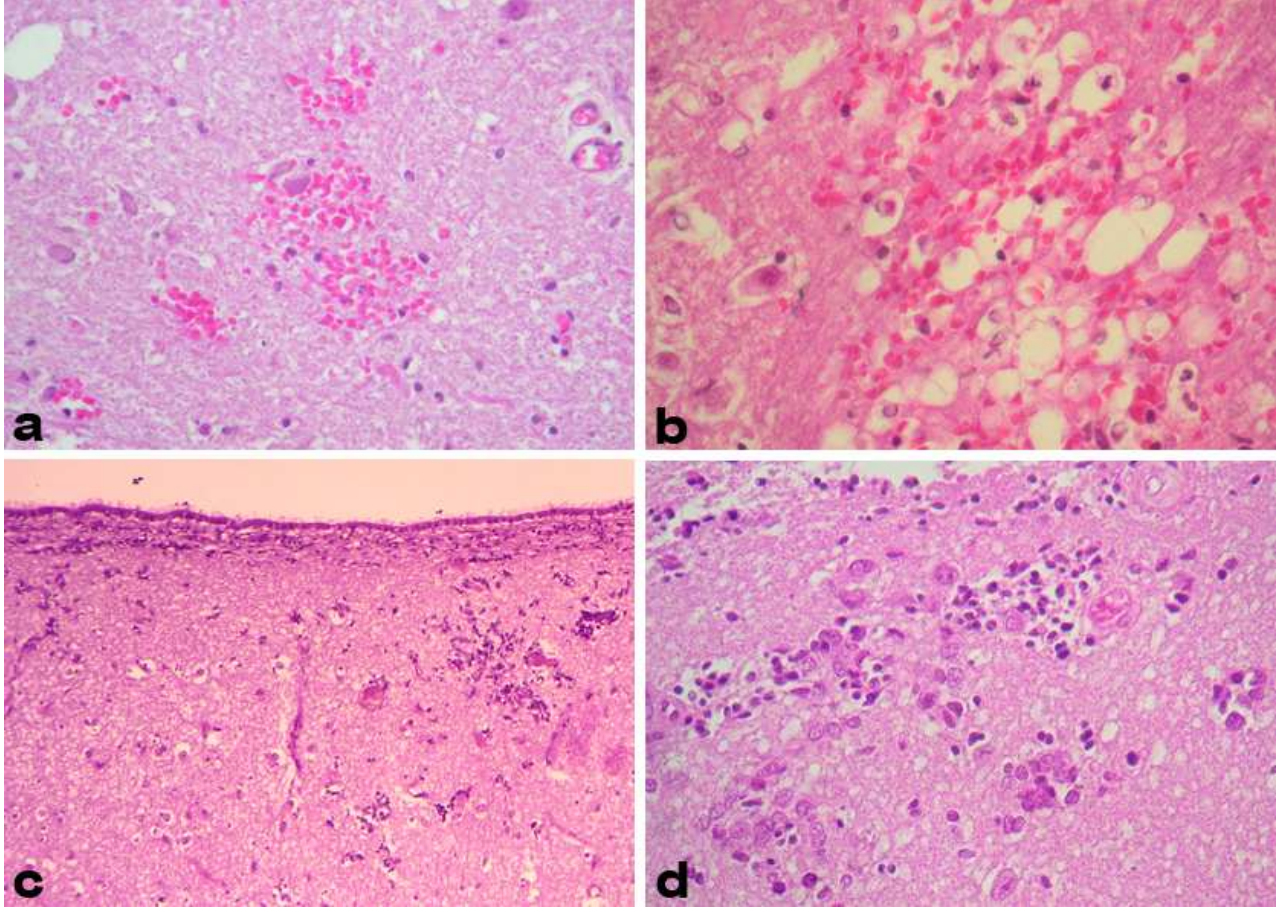


Şekil 6. a) Olgu no. 7. Mezensefalik kanalda genişleme, HE, X 40.
b) Olgu no. 9. Ependimal yassılaşıma ve ondülasyonlar, HE, X 40
c) Olgu no. 6. Subependimal ondulasyon, rozet formasyonları ve yangısal değişiklikler, HE, X 40.
d) Olgu no. 17. Subependimal ondulasyon ve yangısal değişiklikler, HE, X 100
e) Olgu no. 5. Subependimal rozet formasyonları, HE, X 40.
f) Olgu no. 17. Subependimal rozet formasyonlarının yakından görünümü, HE, X 400.

Serebral korteks nöronlarındaki sayısal azalma ve büzüşme yedi olguda (olgu no; 2,4,7,8,10,13,14) göze çarptı. Posterior beyin kökü nukleuslarında vakuolasyon (Şekil 8a ve b) ve aksonal distrofi (olgu no; 3,5-13,15-17,19,20) (Şekil 8c) görüldü. Nöron kayıpları neokortekste, hipokampusta ve bazal nukleusta oldukça belirgindi. Substansiya nigra (olgu no 11,14), reticularis tegmenti, nuclei pontis'te aksonal distrofi ve gliosis (olgu no;12), nuclei tr.solitariai (olgu no;4), nuc. nervi facialis'te (olgu no;5), nucleus n. hypoglossi (olgu no; 3,6), nukleus interkalatus'ta (olgu no;9), nukleus amidoloideus fasciculus longitudinalis medius'ta (olgu no; 20) nöron dejenerasyonu ve vakuoler görünüm mevcuttu. Tektum mezensefali ve nöropilde nöronal dejenerasyon ve vakuolasyon (olgu no; 3,11) satellitozis ve nöronofaji (olgu no; 11) dikkati çekti. Habenula (olgu no; 5,8,15) ve hipokampus, neokorteks amigdala, hipotalamus ve beyin kökündeki pramidial hücrelerde nörofibriler uzantılar (olgu no; 5,13,14,20) göze çarptı (Şekil 8d). Beş olguda (olgu no; 4,6,8,11,15) damar çevrelerinde ödem ve genişleme dikkati çekti. Perivasküler bölgede (olgu no; 3,14,16-20) yağ hücreleri mevcuttu (Şekil 9). Periventriküler bölgede, Virchow Robin boşluklarında genişleme (1,2,4-7,9,10,12,15,17-20) ve mononükleer hücre infiltrasyonları (olgu no; 4,7,10-12,16) görüldü.

Dört olguda (olgu no; 6,8,13,16) serebral hemisferde fokal kalsifikasyonlar dikkati çekti (Şekil 10a ve b). Bir olguda da (olgu no; 12) serebral korteksin derin tabaka ve posterior beyin kökü nöronlarında seroid lipofuksine rastlandı. Bir olguda (olgu no; 4). Bir olguda da (olgu no 6) kornu ammonis'te atrofi göze çarptı.

Yaşlı köpeklerde serebellumda rastlanılan histopatolojik değişiklikler; çoğunlukla Purkinje hücrelerinde azalma (olgu no; 3-8,10-20) (Şekil 10c ve d) ve heterotopi (olgu no; 7,13,16,17,19,20) şeklindeydi. Beş olguda (olgu no; 11,14,16,17,19) Purkinje hücrelerinde vakuolasyon dikkati çekti. Bir olgu da ise (olgu no 5) Purkinje hücrelerinin çevreleri boşalmıştı.

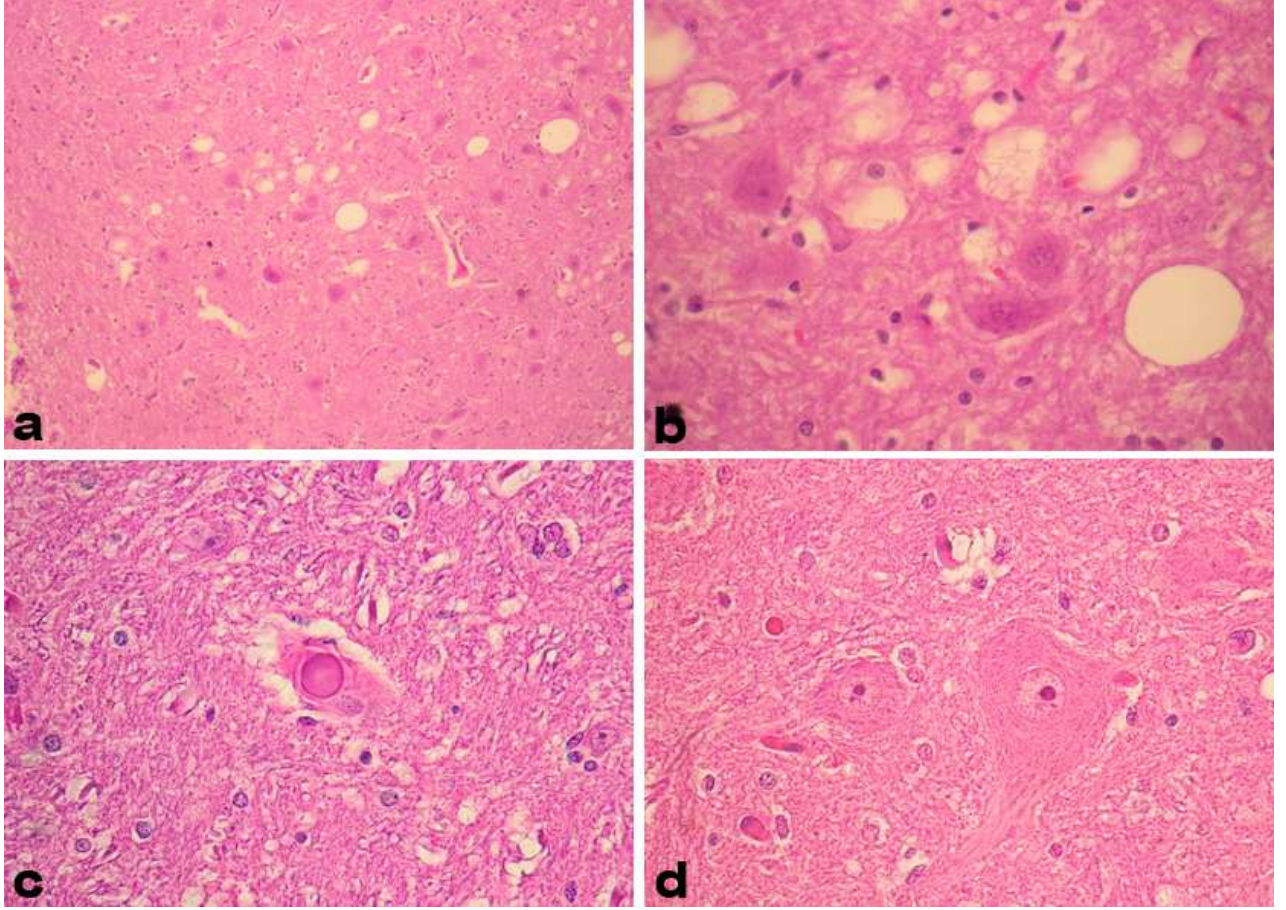


Şekil 7. a) Olgu no. 3. Beyin parankiminde mikrohemoraji alanları, HE, X 100.

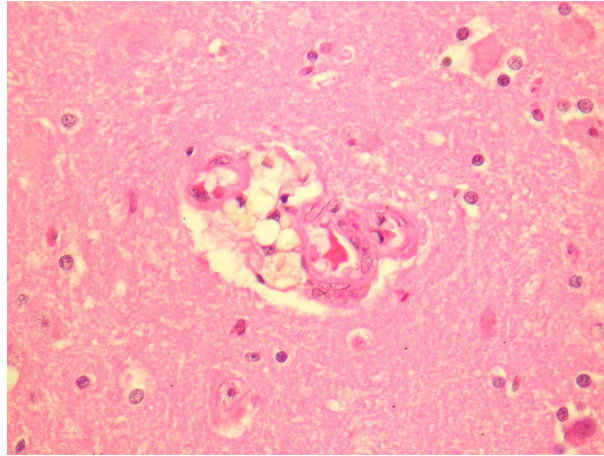
b) Olgu no. 15. Beyin parankiminde mikrohemoraji alanları ve vakuolasyon,
HE, X 400.

c) Olgu no. 17, Subependimal gliosis ve sklerotik değişiklikler, HE, X 40.

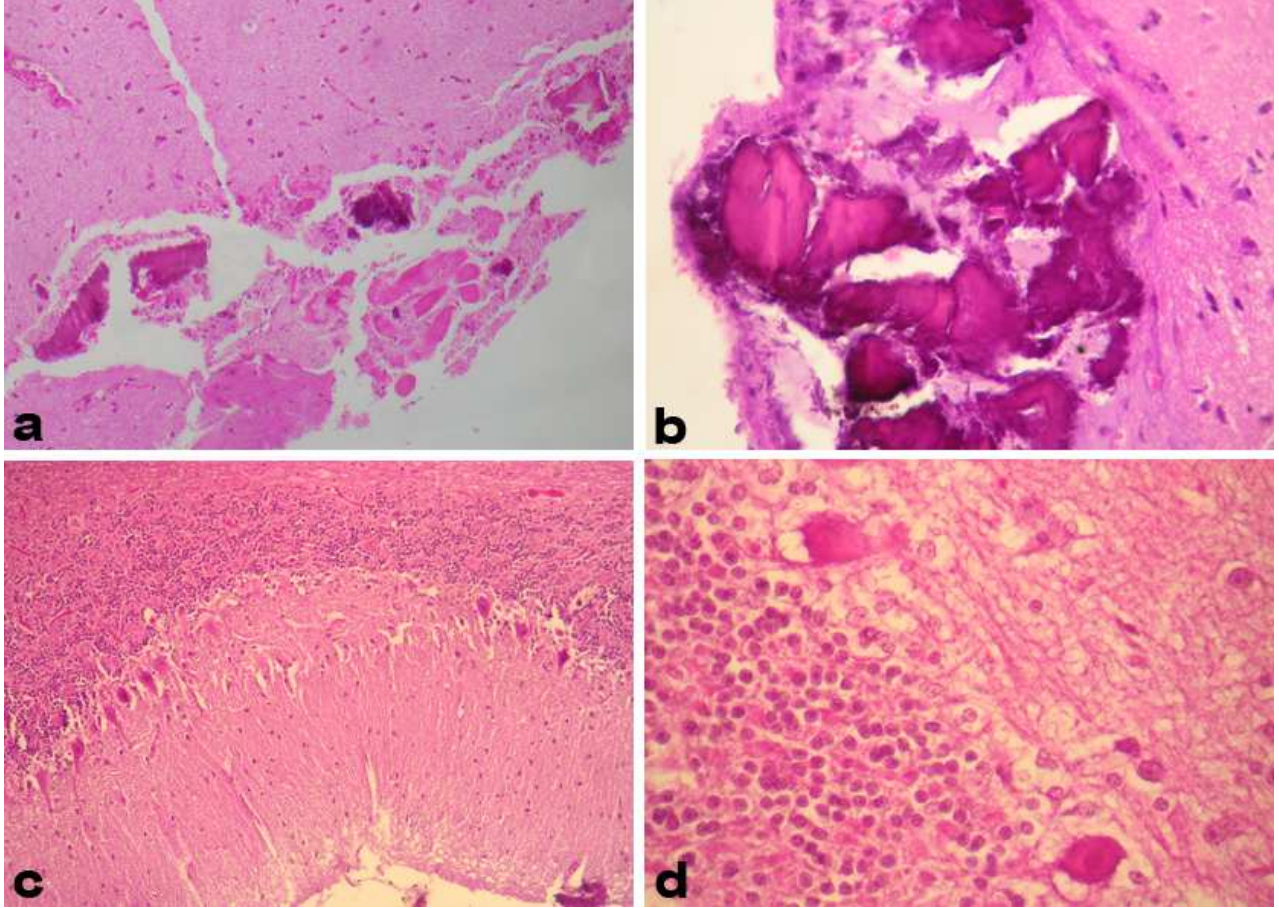
d) Olgu no. 17. Gliosis, yakından görünüm, HE, X 400.



Şekil 8. a) Olgu no. 6. Posterior beyin kökü nukleuslarında vakuolasyon, HE, X 100
b) Olgu no. 6. Posterior beyin kökü nukleuslarında vakuolasyonun yakından görünümü, HE, X 400
c) Olgu no. 20. Aksonal distrofi, HE, X 400.
d) Olgu no. 20. Beyin kökündeki pramidial hücrelerde nörofibriler uzantılar, HE, X 400.



Şekil 9. Olgu no. 16. Perivasküler yerleşimli yağ hücreleri, HE, X 400.



Şekil 10. a) Olgu no. 16. Serebral kortekste kalsifikasyonlar. HE, X 40.

b) Olgu no. 6. Subependimal kalsifikasyonlar. HE, X 400.

c) Olgu no. 5. Cerebellumda Pürkinje hücreleri sayılarında azalma, HE, X 40.

d) Olgu no. 8. Pürkinje hücreleri sayılarında azalma, yakın görünüm cerebellum, HE, X 400.

Olgu No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Meningeal fibrozis	+++	++	+	+++	+++	++	+++	+++	+	-	++	++	+	+++	++	+++	++	+++	+	+++
Koroid pleksusta fibrozis	-	++	++	+++	++	++	-	++	+++	-	+++	+++	+	+++	++	+++	++	++	+++	+++
Damar duvarlarında fibrozis	+++	+++	+	++	+++	++	-	-	+++	+++	-	-	+	+++	++	-	-	-	+++	+++
Damar duvarlarında hiyalinizasyon	+++	-	-	++	++	++	-	-	+++	+++	-	-	+	+++	++	-	-	-	+++	+++
Hemorajiler	-	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++	+++	++	-	++	-	+++
Virchow Robin boşluklarında genişleme	++	+++	-	++	++	+	+	-	++	++	-	++	-	-	++	-	+	+	++	+
Ependimal defektler	-	+++	-	-	++	++	++	-	++	-	++	-	++	++	-	-	-	-	-	-
Serebral nöronlarda azalma	-	++	-	++	-	-	+	++	-	++	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-
Purkinje hücrelerinde azalma	-	-	+	++	++	+	+	+++	-	+++	++	++	++	++	+++	+++	++	+	+++	++
Purkinje hücrelerinde heterotopi	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	++	-	-	+++	++	-	+++	++
Subependimal rozet formasyonları	-	-	-	-	+++	+	++	+	++	-	++	+	+	++	-	-	++	++	-	-
Serebral kalsifikasyon	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Nöroaksonal distrofi	-	-	++	-	++	++	++	++	+	+++	+++	+++	++	-	++	++	-		+	+
Satellitosis ve nöronofaji	-	-	-	-	-	-	-	++	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Perivasküler ödem	-	-	-	++	-	++	-	+	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Serebral kortekste kalsifikasyon	-	-	-	-	-	++	-	+	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nöron dejenerasyonu	++	-	-	++	++	-	-	++	+	+	+++	-	-	++	-	-	-	-	-	-
Perinöronal ödem	-	++	-	-	-	-	-	-	+	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İnfarktus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Perivasküler hücre infiltrasyonu	-	-	-	++	-	-	+			++			++	+	+	+				

Tablo 4: Yaşlı köpek beyinlerinde karşılaşılan histopatolojik değişiklikler.

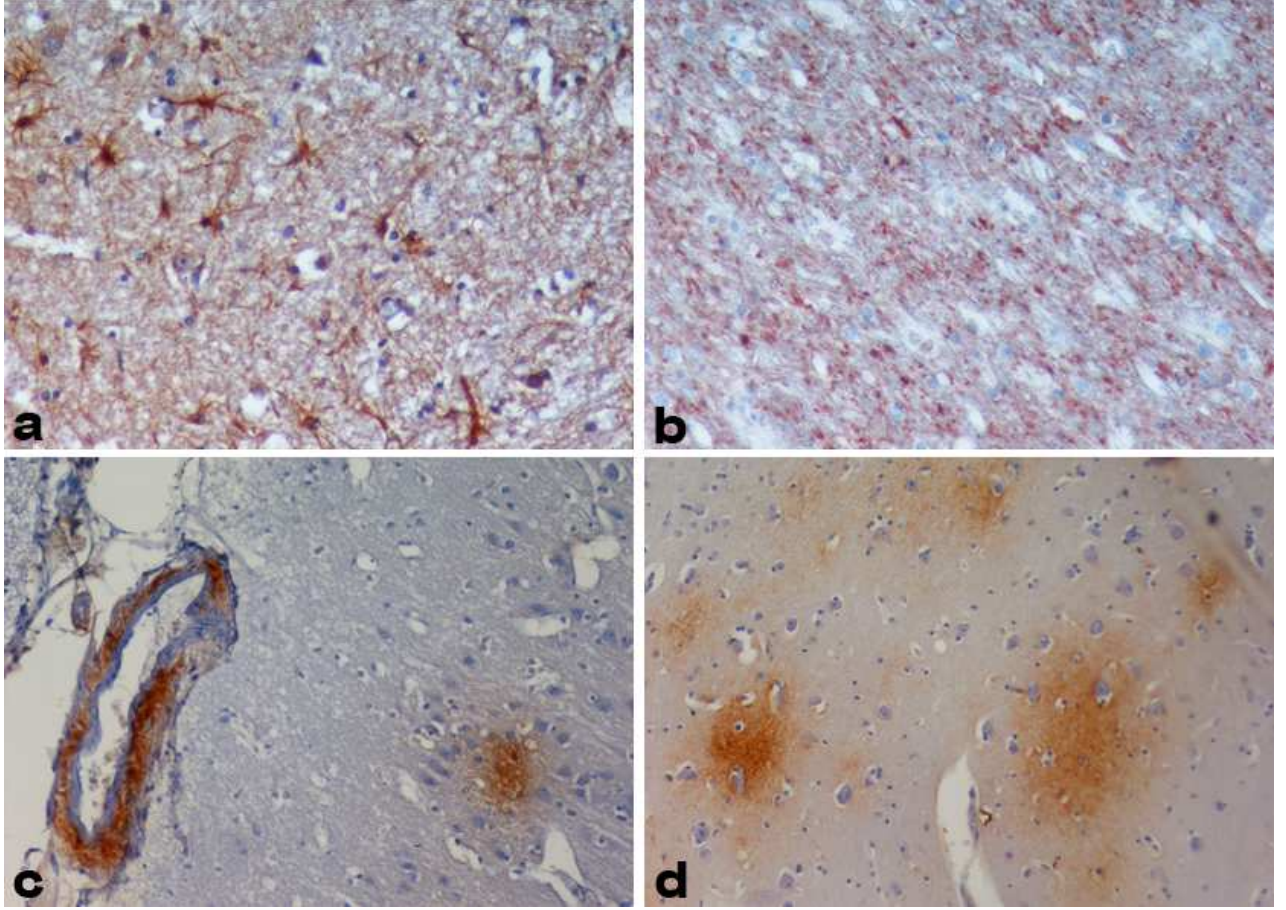
İmmunohistokimyasal Bulgular:

GFAP ekspresyonu genç kontrol köpeklerle karşılaştırıldığında yaşlı köpek beyinlerinde belirgin olarak artmıştı. Yaşlı köpeklerde artmış GFAP ekspresyonu belirgin bir astrogliozise işaret etmekteydi (Şekil 11a). Astrogliozis tablosu bilateral, diffuz olarak göze çarpmaktaydı ve substansia alba'da daha belirgindi. Yaşlı köpeklerdeki GFAP ekspresyonu yaşın ilerlemesi ile doğru orantılı olarak artmaktaydı.

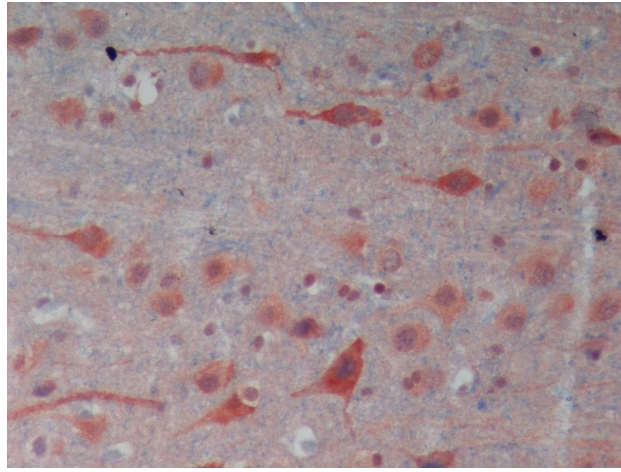
MBP ekspresyonunun yaşlı köpek beyinlerinde göreceli olarak azaldığı görülmekle beraber genç köpek beyinlerindeki MBP ekspresyonu ile yaşlı köpekler arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı.

Yaşlı köpeklerde CNPase ekspresyonunda önemli bir artış görüldü (Şekil 11b). CNPase sonuçları Oligodendrosit sayılarında yaşın ilerlemesi ile birlikte artışın şekillendiğini gösterdi.

Çalışmada yaşlı köpeklerden dokuzunda (olgu no; 6-,9,12,1618,20) meningeal damarlar ve serebral korteksteki kapillar damar duvarlarında (Şekil 11c) nöropil'deki senil plaklarda (Şekil 11d), homojen kümeler halinde β amiloid antiserumu ile oldukça yoğun pozitif reaksiyon gösterdi. Ubiquitin pozitif immunoreaksiyon yalnızca yaşlı köpeklerde beyaz maddede görülürken (Şekil 12) genç köpek beyinlerinde ubiquitin pozitif immunoreaksiyon görülmedi. Yaşlı köpeklerde özellikle histopatolojik lezyonların görüldüğü kısımlarda daha yoğun şekilde HSP 70 ekspresyonu yaşlı köpeklerde önemli ölçüde artmıştı. Buna karşın kontrol olarak HSP 70 antikoru ile boyanan genç köpek beyinlerinde oldukça zayıf boyanmalar da göze çarptı.



Şekil 11. a) Olgu no. 4. İmmunopozitif astrositler, GFAP, ABC-P, X 400.
b) Olgu no. 13. İmmunopozitif boyanmalar, CNPase, ABC-P, X 100.
c) Olgu no. 16. Damar çevresi ve senil plaklarda immunopozitif boyanmalar, β - amyloid, ABC-P, X 100
d) Olgu no. 6. Senil plaklarda immunopozitif boyanmalar, β - amyloid, ABC-P, X 400



Şekil 12. Olgu no. 2. İmmunopozitif alanlar, Ubiquitin, ABC-P, X 400

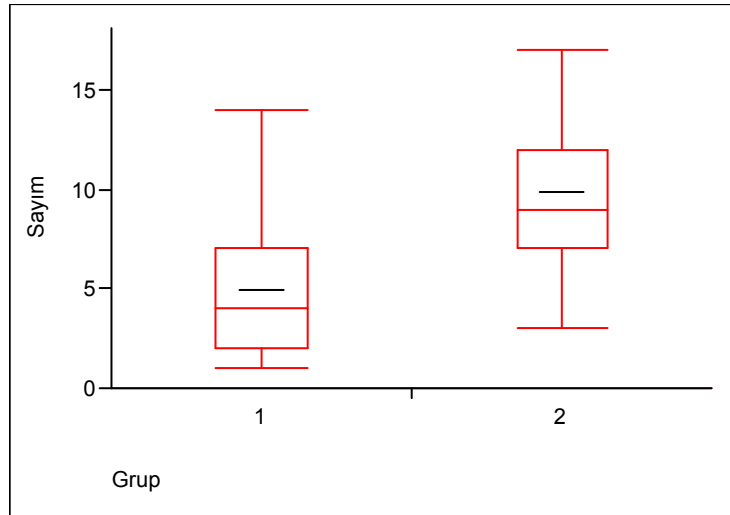
d- İstatistik Bulgular:

GFAP and β amiloid: İstatistiksel olarak senil plak ve amiloid anjiopati bulunmayan (Durum 1), senil plak bulunan (Durum 2) ve senil plak ve amiloid anjiopati bulunan (Durum 3) yaşlı köpeklerdeki GFAP ekspresyonu karşılaştırıldı. Buna göre GFAP ekspresyonundaki artış sırasıyla Durum 3, 1 ve 2 şeklindeydi. Bu durumlar arasındaki farklılıkların önemli olup olmadığı karşılaştırıldığında; yaşlı hayvanlar (Grup1) ile genç hayvanlar (Grup 2) arasındaki fark önemli ($P<0.01$), durum 1 ile 2 ve 3 arasında fark önemli ($P<0.05$), aynı zamanda durum 2 ve 3 arasında fark da önemli ($P<0.01$) bulundu. Her üç durumda da astrosit sayıları arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulundu (Tablo 4, Grafik 1 ve 2).

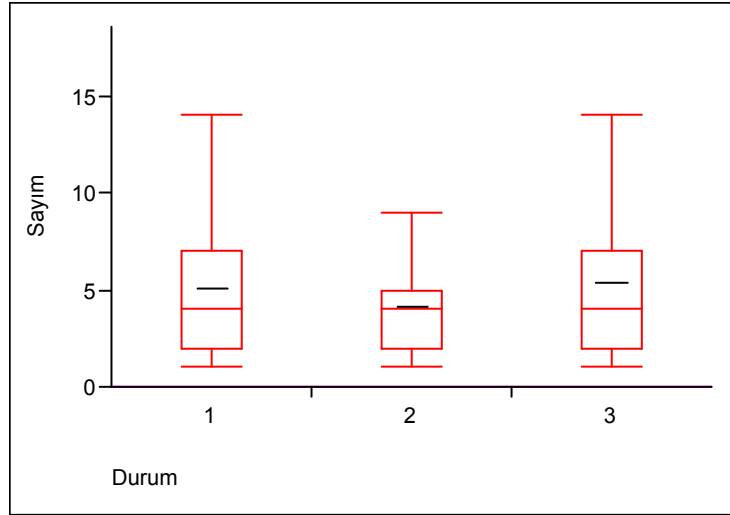
LR Statistics For Type 3 Analysis (Likelihood Ratio)

Source	DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
Grup	1	548.27	** (P<0.01)
Durum	2	46.92	** (P<0.01)
1 ile Diğer	1	3.89	* (P<0.05)
(Linear)			
2 ile 3	1	45.93	** (P<0.01)
(Quadratic)			

Tablo 5. GFAP istatistiksel verileri



Grafik 1. GFAP istatistiksel verilerinin yaşlı ve genç hayvanlarda karşılaştırması



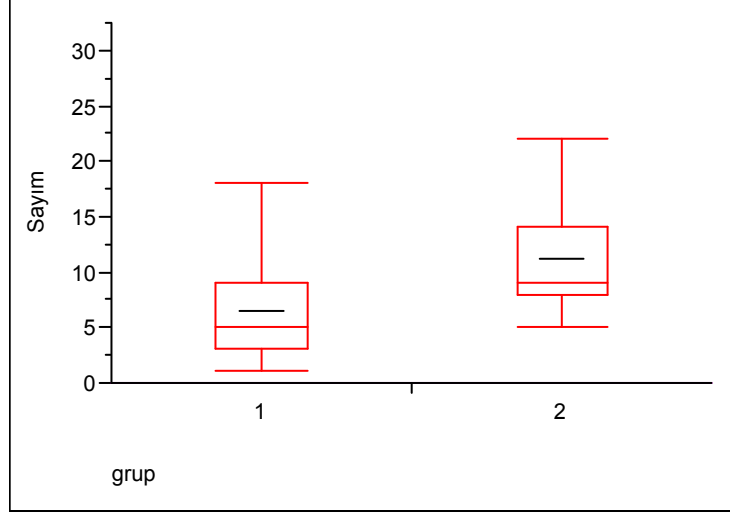
Grafik 2. Yaşlı hayvanlarda GFAP dağılımı.

CNPase: Senil plak ve amiloid anjiyopati bulunmayan (Durum 1), senil plak bulunan (Durum 2) ve senil plak ve amiloid anjiyopati bulunan (Durum 3) yaşlı köpeklerdeki *CNPase* ekspresyonu karşılaştırıldı. Durum 1 ile 2 ve 3 arasında fark önemli ($P < 0.01$) buna karşın durum 2 ve 3 arasında fark önemsiz ($P > 0.01$) bulundu. Senil plak veya senil plak ve amiloid anjiyopatının bir arada olduğu durumda oligodendrosit sayısında fark olmadığı ancak hayvan yaşlıda olsa senil plak veya amiloid anjiyopati yoksa oligodendrosit sayısında istatistiksel açıdan fark olduğu saptandı (Tablo 5, Grafik 3 ve 4).

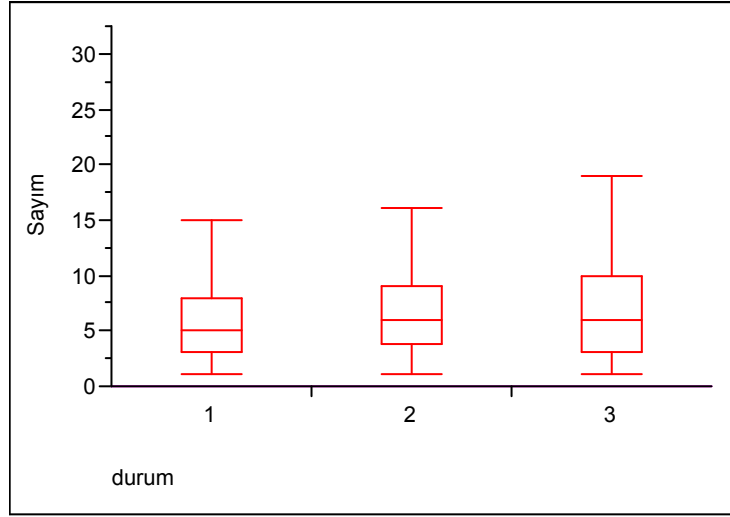
LR Statistics For Type 3 Analysis (Likelihood Ratio)

Source	DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
Grup	1	356.38	** (P<0.01)
Durum	2	10.94	** (P<0.01)
1 ile Diğer	1	7.87	** (P<0.01)
(Linear)			
2 ile 3	1	1.37	Önemsiz (P>0.01)
(Quadratic)			

Tablo 6. *CNPase* istatistiksel verileri



Grafik 3. CNPase için yaşlı ve genç hayvanların karşılaştırması



Grafik 4. Yaşlı hayvanlarda CNPase dağılımı.

V. Sonuç ve Öneriler

Çoğu hayvan türü ile birlikte köpeklerde yaşlanmaya ilgili santral sinir sistemi lezyonları rastlantısal olarak saptanmaktadır. Meningeal kalınlaşma ve kalsifikasyon, vasküler bozukluklar, nöronal glial değişiklikler, beyaz madde dejenerasyonu, lipofuksin birikimi, aksonal şişkinlik ve inklüzyonlar gibi spesifik değişiklikler hayvan türlerinde yayımlanmıştır (1-11,15,19,20). Ancak köpek beyinlerinde yaşa ilgili genel veya özel

değişikler çok az tanımlanmıştır. Yaşlı hayvanlarda beyinde gözlenen makroskobik lezyonlar; beynin sulkus ve giruslarında düzleşme ile ventriküllerde orta düzeyde genişlemelerdir. Benzer değişikliklere insanlarda da rastlandığı kaydedilmektedir. Ancak yaş ve ventriküler genişleme arasında istatistiksel bir korelasyon ortaya konamamıştır (2). Çalışmada köpeklerde yaşlanma ile birlikte beyinde şekillenen makroskobik değişiklikler ayrıntılı olarak ele alınmıştır. Buna göre yaşlanma ile birlikte kontrol olarak kullanılan geç köpekler karşılaştırıldığında yaşlı köpek beyinlerinde rastlanan en yaygın makroskobik değişikliğin leptomeningslerdeki kalınlaşma olduğu görüldü. Bunun dışında olguların % 70'inde bilateral internal hidrosefalus ile %15'inde hemorajilerin şekillendiği görüldü.

Çalışmada santral sinir sisteminde rastlanılan en önemli histolojik değişiklikler yaşla birlikte nöronal dejenerasyon, nöron sayılarında azalma, vasküler değişiklikler ve mikro hemorajiler şeklinde olduğu belirlendi. Serebral amiloid anjiopati ve senil plaklar insan beyinlerinde yaşa bağlı dejeneratif bulgularındandır. Diğer taraftan Alzheimer hastalığının histopatolojik bulgularından da biridir. Köpeklerde de benzer bir tablonun (18) gözleendiği bu çalışmayla da ortaya konmuştur. Astrositik gliozis, fare, sıçan ve makak maymunlarında bildirilmiştir. GFAP pozitif astrositlerin artışı da iddia edilmektedir. Yaşla beraber astrositik hipertrofinin oluştuğuna ilgili çeşitli raporlar mevcuttur. Astrosit başına düşen GFAP volümü astrositi şişirdiği kaydedilmektedir (14,19). Çalışmada da yaşlı köpeklerde GFAP ve CNPase ekspresyonundaki artış yaşlanma ile birlikte santral sinir sisteminde bir gliozis tablosunun şekillendiğini göstermektedir. Ayrıca yaşlı köpeklerde santral sinir sisteminde yaşlanma ile birlikte senil plakların varlığı ve vasküler amiloid toplanması bu çalışmayla immunohistokimyasal olarak da gösterilmiştir. B amiloid'in nörotoksik etkisi apoptotik mekanizmaları hareketle geçirmekte bu durum da nöron kaybı ile sonuçlanmaktadır ve sonuçta insanlarda Alzheimer hastalığı ortaya çıkmaktadır. İnsanlarda Alzheimer hastalığında nöronlarda apoptozis ile birlikte nörofibriler yapılar ile zayıf bir korelasyon saptanmakla beraber senil plak ve hücre ölümü arasında bir ilişki kurulamamıştır (12). Çalışmada da nöronlarda fibriler yapıların varlığı iki olguda ortaya kondu. Ancak konu ile ilgili ayrıntılı immunohistokimyasal çalışmalara gereksinim bulunmaktadır

VI. Kaynaklar

1. Averill, D. R., Jr., D. V. M. (1973). Degenerative Myelopathy in the Aging German Shepherd Dog: Clinical and Pathologic Findings. *JAVMA*, 162, 1045-1051.
2. Borrás, D., Ferrer, I., Pumarola. (1999). Age-related Changes in the Brain of the Dog. *Vet. Pathol.* , 36, 202-211.
3. Cisse, S., Perry, G., Lacoste-Royal, G., Cabana, T., Gauvreau, D. (1993). Immunochemical identification of ubiquitin and heat-shock proteins in corpora amylacea from normal aged and Alzheimer's disease brains. *Acta Neuropathol.* , 85,233-240.
4. Cummins, J.F., DeLahunta, A. (1977). An adult case of canine neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Acta Neuropathol.*, 39, 43-51.
5. Ferrer, I., Pumarola, M., Rivera, R. , Zujar, M. J., Cruz-Sanchez, F., Vidal, A. (1993). Primary central white matter degeneration in old dogs. *Acta Neuropathol.*, 86, 172-175.
6. Garma-Avina, A. (2000). Excretory Plugs from the Choroid Plexus in the Cerebrospinal Fluid of Dogs with Neurological Disease: Possible Role in the Formation of Corpora Arenacea. *J. Comp. Path.*, 123, 146-151.
7. Jian, Z., Alley, M.R., Cayzer, J., Swinney, G.R. (1990). Lafora's disease in an epileptic Basset hound. *NZ Vet. J.*, 38, 75-79.
8. Johnston, P. E. J., Barrie, J. A., McCulloch, M. C., Anderson, T. J., Griffiths, I. R. (2000). Central nervous system pathology in 25 dogs with chronic degenerative radiculomyelopathy. *Vet Rec*, 146, 629-633.
9. Jolly, R. D., Hill, F. I., Hill, J. A., Mehrtens, G. N., Davey, P. M., Hopcroft, D. H. (2002). Polyglucosan body disease in a mixed-breed dog. *NZ Vet J*, 50, 32-35.
10. Hazıroğlu, R. (2000). Sinir Sistemi. In: *Veteriner Patoloji* , Milli Ü.H., Hazıroğlu, R. Medipres, Ankara, S; 262-301.
11. Kamiya, S., Suzuki, Y., Daigo, M. (1991). Polyglucosan bodies in the central nervous system of a fox. *J.Comp.Pathol.*, 105, 467-470.

12. Kiatipattanasakul, W., Nakamura, S., Hossain, M. M., Nakayama, H., Uchino, T., Shumiya, S., Goto, N., Doi, K. (1996). Apoptosis in the aged dog brain. *Acta Neuropathol.*, 92, 242-248.
13. Okuda, R., Uchida, K., Tateyama, S., Yamaguchi, R., Nakayama, H., Goto, N. (1994). The distribution of amyloid beta precursor protein in canine brain. *Acta Neuropathol.*, 87, 161-167.
14. Shimada, A., Kuwamura, M., Awakura, T., Umemura, T., Itakura, C. (1992). An Immunohistochemical and Ultrastructural Study on Age-Related Astrocytic Gliosis in the Central Nervous System of Dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, 54, 29-36.
15. Summers, B.A., Cummings, F.F., de-Lahunta, A. (1995). *Neuropathology of Aging In: Veterinary Neuropathology*. Mosby-Year Book, Ithaca, New York. S; 49-67.
16. Uchida, K., Miyauchi, Y., Nakayama, H., Goto, N. (1990). Amyloid angiopathy with cerebral hemorrhage and senile plaque in aged dogs. *Jpn.J.Vet.Sci.*, 52, 605-611.
17. Uchida K., Nakayama, H., Tateyama, S., Goto, N. (1992). Immunohistochemical analysis of constituents of senile plaques and cerebro-vascular amyloid in aged dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, 54, 1023-1029.
18. Uchida K., Okuda, R., Yamaguchi, S., Tateyama, S., Nakayama, H., Goto, N. (1993). Double-labeling immunohistochemical studies on canine senile plaques and cerebral amyloid angiopathy. *J. Vet. Med. Sci.*, 55, 637-642.
19. Uchida, K., Tani, Y., Uetsuka, K., Nakayama, H., Goto, N. (1992). Immunohistochemical Studies on Canine Cerebral Amyloid Angiopathy and Senile Plaques. *J. Vet. Med. Sci.*, 54, 659-667.
20. Wisniewski, T., Lalowski, M., Bobik, M., Russell, M., Strosznajder, j., Frangione, B. (1996). Amyloid β 1-42 deposits do not lead to Alzheimer's neuritic plaques in aged dogs. *Biochem. J.*, 313, 575-580.

VII. Ekler

a-Mali bilanço ve açıklamaları

Çalışmanın sarf kaleminde yer alan harcamalar (kimyasal madde, immunohistokimya malzemeleri ve cam malzemesi vs.) çalışma materyalinin temin edilmesi, makroskobik, mikroskobik ve immunohistokimyasal değerlendirmelerin yapılabilmesi amacıyla kullanılmıştır.

Çalışmanın makine ve teçhizat kaleminde belirtilen bir adet rotary mikrotom çalışma süresince kullanılmış olup halen çalışır durumdadır.

b-Makine ve teçhizatın konumu ve ilerideki kullanımına ilişkin açıklamalar

Proje kapsamında satın alınan rotary mikrotom Anabilim Dalı'nda kayıtlı ve halen çalışır durumdadır. Şu anda Anabilim Dalı'ndaki rutin olarak kullanılmakta ve ileride yapılacak çalışmalarda da kullanılabilir.

c-Teknik ve bilimsel açıklamalar

d-Sunumlar

Çalışmanın ilerideki bilimsel toplantılarda sunulması planlanmaktadır.

e-Yayınlar ve tezler

Çalışmanın uluslar arası hakemli bilimsel dergilerde yayınlanması planlanmaktadır.