



ARAŞTIRMA MAKALESİ

Sığır leptospirozunun patogeneğinde ubiquitin ve 8-hidroksiguanozin'in rollerinin immunohistokimyasal yöntemlerle araştırılması

Musa Karaman^{1*}, Hasan Özen¹, Serpil Dağ Erginsoy¹, Mitat Şahin²

Özet

Karaman M, Özen H, Erginsoy SD, Şahin M. Sığır leptospirozunun patogeneğinde ubiquitin ve 8-hidroksiguanozin'in rollerinin immunohistokimyasal yöntemlerle araştırılması. *Eurasian J Vet Sci*, 2010, 26, 1, 33-38

Amaç: Bu çalışmada, *Leptospira* spp. ile doğal enfekte sığırların karaciğer ve böbrek dokularında oluşan hasarda ubiquitin ve 8-hidroksiguanozin'in (8-OHG) rolleri araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Leptospirozlu (n=7) ve sağlıklı kontrol grubu (n=7) hayvanlarda, bu moleküllere spesifik poliklonal antikorlar kullanılarak indirekt immunoperoksidaz metodu ile antijenlerin dokulardaki lokalizasyonları belirlendi.

Bulgular: Leptospirozlu hayvanların karaciğer hepatositleri ve böbrek tubul epitellerinde ubiquitin antikoruna karşı intrasitoplazmik immün boyanma tespit edildi. 8-OHG immün boyanmasının karaciğer hepatositlerinde intrasitoplazmik ve/veya intranükleer, böbrek tubul epitellerinde ise çoğunlukla intrasitoplazmik olarak lokalize olduğu gözlemlendi.

Öneriler: Leptospirozun patogeneğinde doku hasarı oluşumunda ubiquitin ile 8-OHG'nin rol oynadığı ortaya konularak, bu moleküllere ilişkin mekanizmaları daha detaylı anlayabilmek için ayrıntılı çalışmaların gerekliliği tavsiye edilmektedir.

Abstract

Karaman M, Ozen H, Erginsoy SD, Sahin M. Immunohistochemical investigation of the role of ubiquitin and 8-hydroxyguanosine in pathogenesis of cattle leptospirosis. *Eurasian J Vet Sci*, 2010, 26, 1, 33-38

Aim: This study was performed to investigate the role of ubiquitin and 8-hydroxyguanosine (8-OHG) expression in liver and kidney tissue damage in *Leptospira*-infected cattle.

Material and Method: Localization of these molecules was determined by indirect immunoperoxidase method using specific polyclonal antibodies in *Leptospira* positive (n=7) and healthy control animals (n=7).

Results: A cytoplasmic immunostaining in the hepatocytes and kidney tubule epithelia against ubiquitin antibody was detected in *Leptospira*-infected animals. Immunostaining against 8-OHG antibody was seen intracytoplasmic and/or intranuclear in the hepatocytes, while it was mostly intracytoplasmic in kidney tubule epithelia.

Conclusion: As ubiquitin and 8-OHG were shown to play roles in pathogenesis of leptospirosis, further detailed studies to investigate and to wholly understand the mode of mechanisms of these molecules are suggested.

¹Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji AD,
²Mikrobiyoloji AD, Paşaçayırı, 36100, Kars, Türkiye

Geliş: 20.04.2010, Kabul: 27.04.2010
*mkaraman45@hotmail.com

Anahtar kelimeler: Leptospiroz, ubiquitin, 8-hidroksiguanozin, patogeneze, sığır

Keywords: Leptospirosis, ubiquitin, 8-hydroxyguanosine, pathogenesis, cattle

► Giriş

Leptospirozis, insan ve çeşitli hayvan türlerinde, patojen *Leptospira interrogans* serovaryoları tarafından oluşturulan ve dünyada yaygın olarak görülen zoonotik bir hastalıktır (WHO 1999, Michel ve ark 2002). Sığır leptospirozu iştahsızlık, yüksek ateş, sarılık, hemoglobüri, hemolitik anemi, infertilite, abortus, ölü doğum ve septisemi ile karakterizedir (Ellis 1984, Langoni ve ark 1999, Dutta ve Christopher 2005). Ülkemizde Doğu Anadolu Bölgesinde serolojik yöntemler ile yapılan çalışmalar sonucunda sığırlarda en fazla *L. grippityphosa* ve *L. hardjo* tespit edildiği rapor edilmiştir (Tuncel ve Ögütman 1975, Bulu ve ark 1990, Çetinkaya ve ark 1999, Şahin ve ark 2002).

Leptospira enfeksiyonlarında karaciğerde nekroz (Lomar ve ark 2000) ve apoptoz şekillendiği (Plank ve Dean 2000), böbreklerde intersitisyel nefritis meydana geldiği kaydedilmektedir (Sitprijja ve ark 1980, Thompson ve Manktelow 1989, Yang ve ark 2001). Bu organlarda meydana gelen lezyonların patogenezi ile ilgili çalışmalar ise kısıtlıdır.

Doku hasarının oluşumunda reaktif oksijen türlerinin (ROT) önemi bilinmektedir. Metabolik sürecin bir parçası olarak hücreler sürekli ROT üretmekte, ancak fizyolojik koşullarda üretilen bu ROT antioksidan mekanizmalar ile temizlenmektedir (Nordberg ve Arner 2001). Fiziksel, kimyasal ve enfeksiyöz nedenlere ilişkin olarak üretilen aşırı miktardaki ROT ile bunları temizleyen mekanizmalar arasındaki dengenin bozulması sonucu hücrenin lipid, protein ve nükleik asit gibi molekülleri hasara uğrayabilmektedir. Bu süreçte, hasarlı proteinlerin yıkılmasında hücrelerin sitoplazma ve çekirdeklerinde bulunan, ısıya dayanıklı, 76 amino asitli bir protein olan ubiquitin önemli bir rol oynamaktadır (Yamao 1999, Selvarajah ve Moumen 2010). Ubiquitin ile konjuge olan proteinler, hücre içerisinde yer alan ve 26S proteazom olarak adlandırılan proteaz parçacığı ile yıkımlanırlar (Baumeister ve ark 1998). ROT tarafından saldırıya uğrayan DNA ve RNA'da, hücre hasarının başlangıcında guanin bazlarından 8-Hidroksiguanozin (8-OHG) oluşturulur (Fiala ve ark 1989). Bu nedenle nükleik asitlerde meydana gelen hasarın bir göstergesi olarak, 8-OHG'ne karşı üretilen antikorlardan yararlanılarak hasarlı DNA ve RNA molekülleri dokularda tespit edilebilir.

Bu çalışmanın amacı, doğal olarak *Leptospira* spp. ile enfekte sığırların karaciğer ve böbrek dokularındaki hasarların oluşumunda bir oksidatif stres belirteci olan 8-OHG ve hasarlı proteinlerin yıkılmasına neden olan ubiquitin'in rol alıp almadığını belirlemektir.

► Gereç ve Yöntem

Çalışma materyalini, 2004-2007 yılları arasında Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesine getirilen ve yaşları 1 ile 6 yıl arasında değişen 7 adet Leptospirozlu sığır oluşturdu. Bu hayvanlardan 3'ü İç Hastalıkları Kliniğine ateş ve sarılık bulguları ile getirilen an-

cak tedavi sürecinde ölen, 4'ü Patoloji Anabilim Dalına nekropsi amacıyla getirilen ölmüş sığırlardan oluşmaktaydı. Canlı hayvanlardan idrar örnekleri alınarak karanlık saha mikroskobu ile incelendi. Kontrol amacı ile klinik olarak sağlıklı ve mezbahada kesimi yapılan 7 adet sağlıklı sığır kullanıldı.

Sistemik nekropsileri yapılarak makroskopik olarak incelenen 7 adet Leptospirozlu sığırdan histopatolojik incelemeler için tüm organlardan doku örnekleri alındı. Toplanan doku örnekleri %10'luk nötral formalin solüsyonunda tespit edildi. Rutin yöntemlerle hazırlanan parafin bloklardan 5µ kalınlığında kesitler alınarak hematoksilen-eozin ile boyandı.

Leptospiral antijenleri ortaya koymak amacıyla Leptospiroz şüpheli ve kontrol hayvanların karaciğer ve böbrek dokularından 4 µm kalınlığında kesitler poly-L-Lyzin kaplı lamlara alınarak immunoperoksidaz yöntemi ile boyandı. Adana Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden temin edilen *L. grippityphosa* hiperimmün serumu (1/100 dilüsyonda) ile inkübe edilen doku kesitlerinde streptoavidin-peroksidaz ticari kiti (Zymed Histostain-Plus Bulk Kit, Invitrogen Ltd, UK) ve AEC (Sigma AEC Chromogen Kit, USA) kullanılarak antijenlerin lokalizasyonları belirlendi.

Leptospira spp. ile enfekte ve kontrol hayvanların karaciğer ve böbrek dokularında ubiquitin (rabbit anti-ubiquitin polyclonal antibody, GeneTex, USA) ve 8-OHG (Goat anti-8-Hydroxyguanosine antibody, USBiological, USA) antikorları sırasıyla 1/100 ve 1/200 dilüsyonlarında kullanılarak, streptoavidin-peroksidaz metodu ve DAB (Zymed Liquid DAB-Plus Substrate Kit, Invitrogen Ltd, UK) ile dokularda ubiquitin ve 8-OHG'nin antijenik lokalizasyonları belirlenmeye çalışıldı. Negatif kontrol amacıyla primer antikor yerine nonimmün serum kullanılarak aynı yöntemler tekrar edildi.

► Bulgular

Kliniğe getirilen hayvanların idrar örneklerinin karanlık saha mikroskobunda doğrudan incelenmesinde 3 hayvanda da *Leptospira* yönünden pozitif sonuç gözlemlendi.

Nekropsileri yapılan hayvanların makroskopik incelemelerinde değişen derecelerde sarılık ve anemi gözlemlendi. Karaciğerler büyümüş, yumuşak kıvamda, sarımsı renkte ve peteşiyel kanamalar içermekteydi. Böbrekler şişkin ve ödemli olup, kapsula kaldırıldığında parankimde beyaz renkte odaklar tespit edildi. Akciğer, kalp, mezenteriyel ve mediastinal lenf düğümlerinde de peteşiyel kanamalar belirlendi.

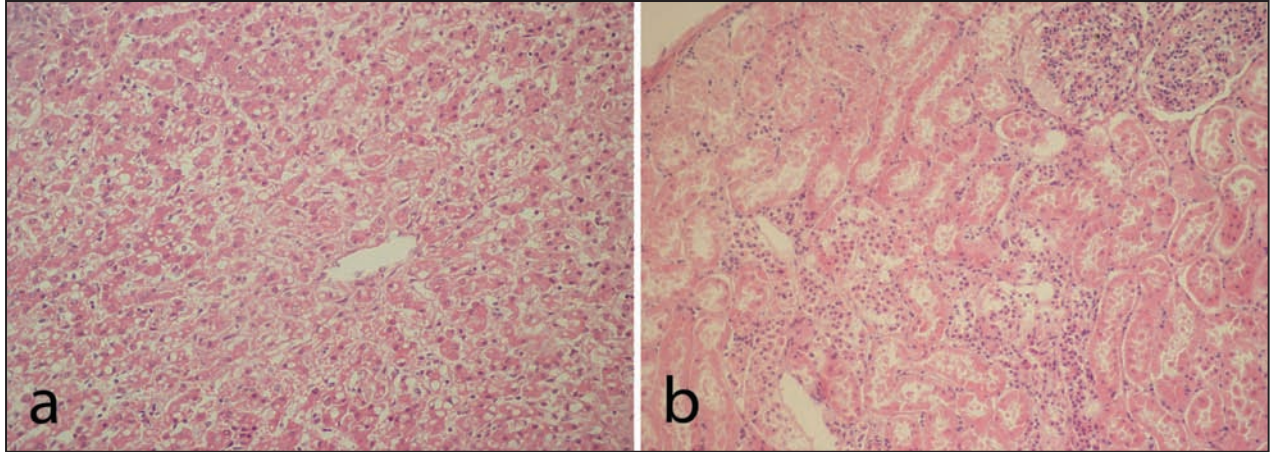
Histopatolojik incelemelerde Leptospirozlu hayvanlarda karaciğerde vena sentralislerin çevresinde daha fazla olmak üzere gelişigüzel dağılımlı dejeneratif ve nekrotik hepatositler görüldü. Nekrotik alanlarda ve portal bölgelerde lenfosit, plazma hücresi, makrofaj ile az miktarda nötrofil granülosit içeren yangısal hücre infiltrasyonları belirlendi (Resim 1a). Böb-

reklerde proksimal ve distal tubul epitellerinde yaygın nekrozlar görüldü. Tubul lümenlerinde dökülmüş epitel hücreleri ve hiyalin silindirleri ile intersitisyel bölgelerde fokal mononükleer hücre infiltrasyonları tespit edildi (Resim 1b). Kontrol hayvanların karaciğer ve böbrek dokularında herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı.

Leptospira antijenlerine karşı uygulanan immunohistokimyasal yöntemlerde karaciğerde hepatositler, Kupffer hücreleri ve makrofajların sitoplazmaların-

sim 3d) sitoplazmalarında immun boyanma belirlendi.

8-Hidroksiguanozin immun boyanmalarında kontrol grubu hayvanların karaciğer (Resim 4a) ve böbrek (Resim 4c) dokularında boyanma gözlenmedi. Leptospirozlu hayvanlarda hepatositlerin çekirdek ve/veya sitoplazmalarında (Resim 4b), tubul epitellerinin (Resim 4d) ise çoğunlukla sitoplazmalarında immun boyanma tespit edildi.

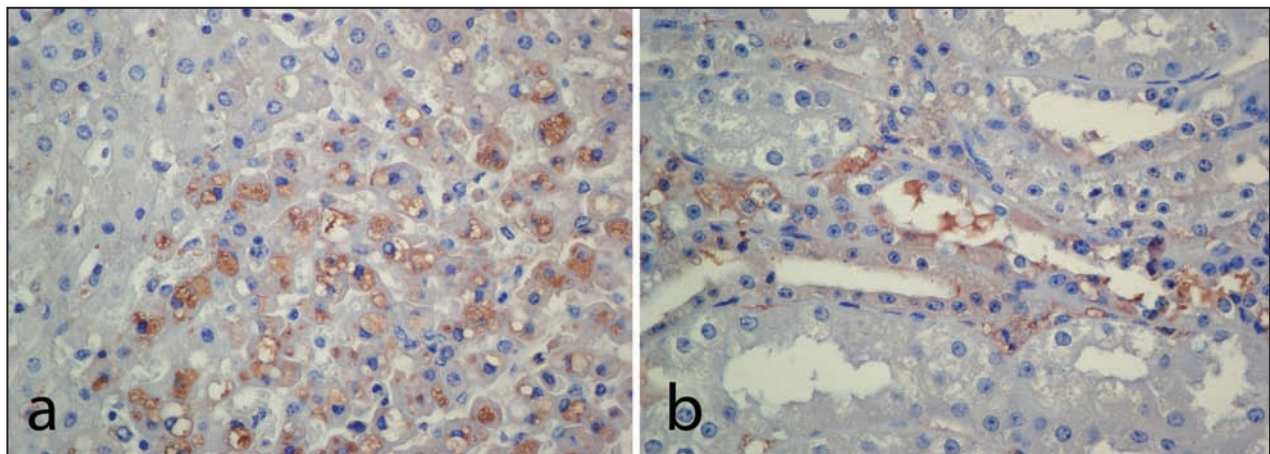


Resim 1: (a) Leptospirozlu bir sığır karaciğerinde sentrilobuler alanda daha yoğun olmak üzere dejeneratif ve nekrotik hepatositler ve (b) böbrekte tubul epitellerinde dejenerasyon ve nekroz, tubul lümenlerinde dökülmüş epitel ve hiyalin silindirleri ile intersitisyel alanda mononükleer hücre infiltrasyonları. X 185. H.E.

da immun boyanma tespit edildi (Resim 2a). Böbrekte proksimal ve distal tubul epitellerinin sitoplazması ve tubul lümenleri ile intersitisyel bölgede yoğun immunreaktivite belirlendi (Resim 2b). Kontrol hayvanların karaciğer ve böbrek dokularında Leptospira antijenleri immunohistokimyasal yöntemlerle gözlenmedi.

► Tartışma

Sığır Leptospirozunda oluşan klinik ve patolojik bulgular iyi tanımlanmış olmasına rağmen, hastalıkta meydana gelen değişikliklerin patogenezi tam olarak bilinmemektedir. Makroskobik ve mikroskobik olarak karaciğer ve böbrek dokularında şekillenen patolojik

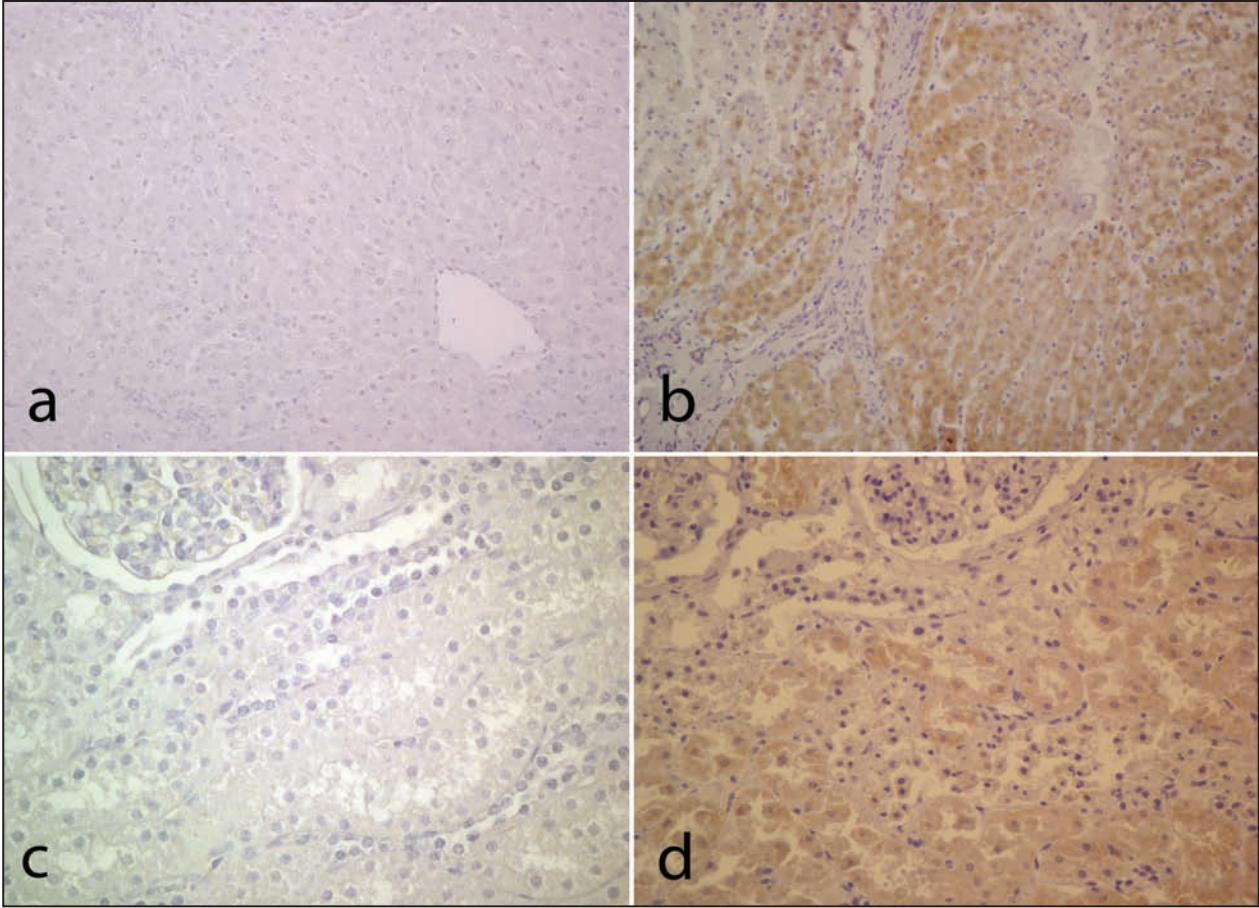


Resim 2: Leptospiral antijenlerin immunohistokimyasal olarak belirlenmesi. (a) Karaciğerde hepatositler ve Kupffer hücrelerinin sitoplazmaları ile hücre dışı yerleşimi, (b) böbrekte ise tubul epitelleri ile tubul lümenlerinde pozitif reaksiyonlar. X 370. Streptoavidin-peroksidaz

Ubiquitin için yapılan immunohistokimyasal boyamalarda, karaciğer (Resim 3a) ve böbrek (Resim 3c) dokusunda kontrol grubu hayvanlarda immunreaktiviteye rastlanmazken, Leptospira pozitif hayvanlarda hepatositlerin (Resim 3b) ve tubul epitellerinin (Re-

ğişiklikler ise detaylı olarak tanımlanmıştır (Yener ve Keleş 2001, Dutta ve Christopher 2005).

Leptospirozun patogenezinde etkenin yapısında yer alan lipopolisakkarid, glikoprotein, sfingomyelinaz,



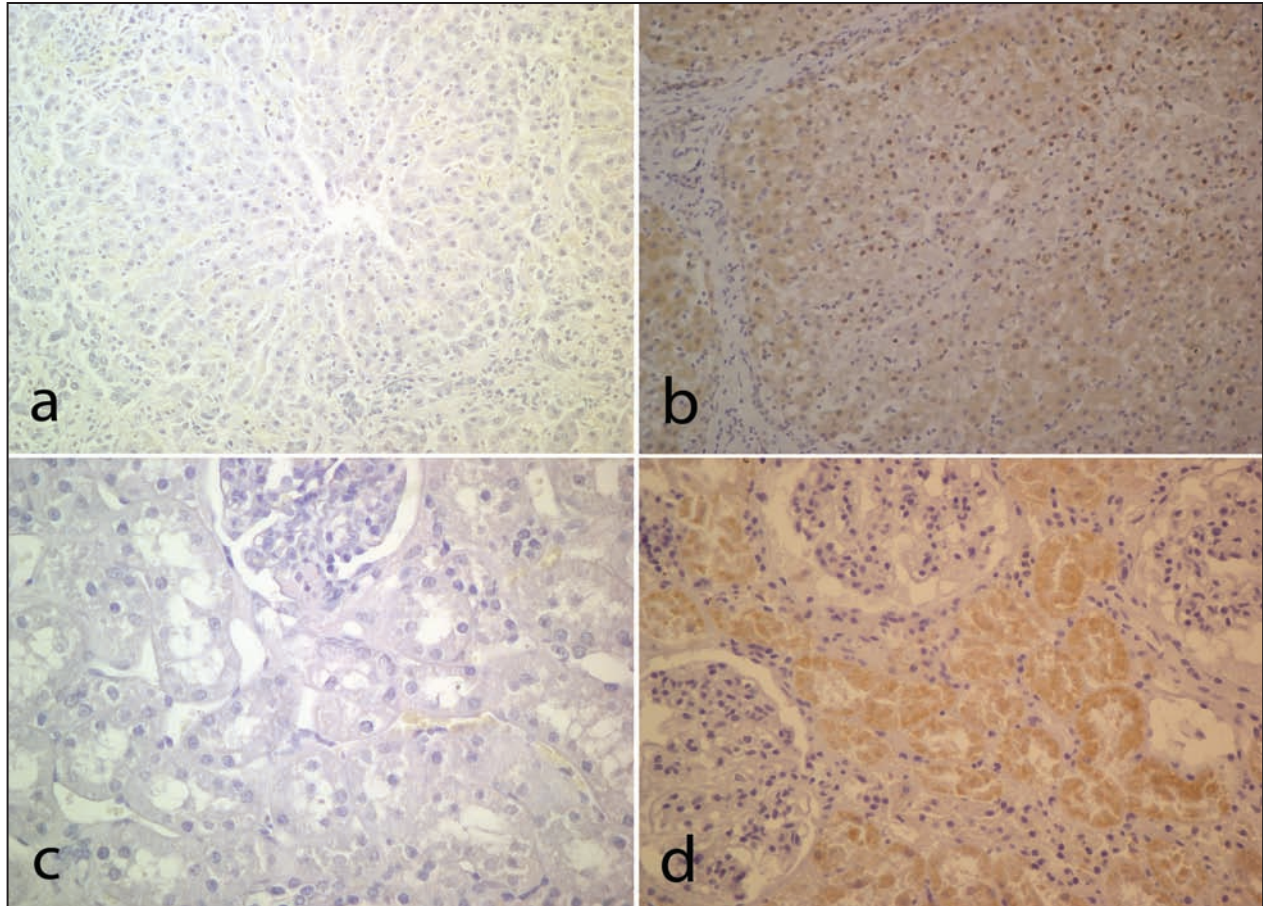
Resim 3: Ubiquitin için immun boyama. (a) Kontrol grubu, karaciğer, immunreaktivite yok. (b) *Leptospira* enfekte bir hayvanda hepatositlerde intrasitoplazmik immun boyanma. X 185. (c) Kontrol grubu, böbrek, immun boyanma negatif. (d) Enfekte bir hayvanda tubul epitellerinde intrasitoplazmik immun boyanma. X 370. Streptoavidin-peroksidaz.

hemolizin gibi birçok virulent faktörün rol oynadığı vurgulanmaktadır (Lee ve ark 2000). Ayrıca indirekt olarak yangısal cevaba ilişkin hücre hasarı da oluşabilmektedir (Barnett ve ark 1999, Spichler ve ark 2007). Mikroorganizmaların böbrek ve karaciğer gibi parankimatöz organlara invazyonunu takiben yukarıdaki virulent faktörleri aracılığıyla hastalık tablosu oluşmaktadır. Hastalıkta, karaciğerde santral nekroz (Lomar ve ark 2000), hepatositlerde apoptoz (Plank ve Dean 2000) ile böbreklerde intersitisyel nefritis ve tubular nekroz (Sitprijia ve ark 1980, Yang ve ark 2001) gözlemlendiği kaydedilmektedir. Sunulan bu çalışmada da *Leptospira* spp. ile enfekte hayvanlarda karaciğer ve böbrek dokularında gözlenen dejenerasyon, nekroz ile yangısal hücre infiltrasyonları literatürle uyum göstermektedir (Skilbeck ve ark 1988, Yener ve Keleş 2001, da Silva ve ark 2005).

Genel olarak, hücre hasarının oluşumunda ROT'nin önemli rol oynadığı bilinmektedir. Yangının seyri sırasında üretilen hidroksil radikali, süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit, ya yangı bölgesindeki lökositlerden ya da antioksidan dengenin bozulması sonucu hücre içerisinde üretilmektedir (Nordberg ve Arner 2001). Oluşan ROT, hücrede DNA hasarına, lipid peroksidasyonuna ve proteinlerdeki amino asitlerin oksidasyonuna neden olmaktadır (Evans ve ark 2004,

Roy 2007).

Hasar görmüş proteinlerin yıkımlanması hücre içerisinde başlıca enerjiye bağımlı ubiquitin-proteazom yolu ile olmaktadır (Baumeister ve ark 1998). Ubiquitin aracılı protein yıkımlanması stres yanıtı, hücre siklusu, gen ekspresyonu ve apoptoz dahil bir çok hücre sel sürecin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Pirim ve ark 2000, Cadima-Couto ve ark 2009). Sunulan bu çalışmada *Leptospira* spp. ile enfekte hayvanların karaciğer ve böbrek dokularında ubiquitin için yapılan immun boyanmalarda genel olarak yoğun immunreaktivite gözlemlendi. Karaciğerde immun boyanmanın bazı hepatositlerde daha yoğun bazılarında ise daha az olarak şekillenmesi, bu hücrelerde ya farklı derecelerde hasar olduğu ya da hasarın farklı dönemlerini ifade ettiği yönünde yorumlanabilir. Böbrek dokularında ise daha yoğun ve homojen bir immun boyanmanın bulunması, bu organda *Leptospira* spp.'nin şiddetli yıkımlanmaya neden olduğunun bir göstergesi olabilir. Bu doku yıkımlanmasının oksidatif strese bağlı olarak şekillenebileceğine ait bulgular, Erdogan ve ark (2008) tarafından bildirilmiştir. Bu araştırmacılar yaptıkları çalışmada, doğal olarak *Leptospira* spp. ile enfekte 12 sığırdaki serum malondialdehit ve nitrik oksit seviyelerinde yükselme olduğunu, buna karşın indirgenmiş glutatyon düzeyinde



Resim 4: 8-hidroksiguanozin immun boyaması. (a) Kontrol grubu, karaciğer, immunreaktive yok (b) Leptospirozlu bir hayvanda hepatositlerde intranükleer ve/veya intrasitoplazmik boyanma. X 185. (c) Kontrol grubu, böbrek, immun boyanma yok. (d) Enfekte bir hayvanda tubul epitellerinde çoğunlukla intrasitoplazmik ve tek tük intranükleer boyanmalar. X 370. Streptoavidin-peroksidaz.

ise belirgin azalma şekillendiğini göstererek Leptospirozun patogenezinde ROT'nin etkin rol oynadığını belirtmişlerdir. Ubiquitin immun boyamalarında elde ettiğimiz sonuçlar ile yukarıda belirtilen çalışmanın verileri birlikte değerlendirildiğinde, Leptospirozda ROT'nin üretildiği, buna bağlı olarak protein hasarının oluştuğu ve hasarlı proteinlerin ubiquitin aracılığıyla yıkılmak üzere konjuge edildiği söylenebilir.

Oksidatif stres, hücrede protein hasarının yanı sıra DNA ve RNA'da da bozukluklara neden olmaktadır. Nükleik asitlerde ROT, guanin bazlarında hidroksilasyona neden olarak DNA'da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin, RNA'da ise 8-oxo-7,8-dihidroganozin oluşturmaktadır (Kasai ve ark 1991). RNA oksidatif strese DNA'dan daha duyarlıdır (Fiala ve ark 1989, Wamer ve Wei 1997). Özellikle mRNA'ların intrasitoplazmik dağılımının yaygın olması, nispeten çok bulunması, tek zincir yapısında bulunması ve koruyucu histonlar içermemeleri nedeniyle oksidatif hasara daha çok maruz kalabilmektedirler (Shan ve ark 2007). DNA'da oluşan oksidatif hasar DNA tamir mekanizmaları, RNA'dakiler ise kısmen hızlı yenilenme ile onarılmaktadır (Wamer ve ark 1997). mRNA'da oluşan oksidatif hasar hücrenin protein sentezini azaltmakta veya bozuk protein sentezine yol açmaktadır (Shan ve ark 2007). Bunun so-

nucunda hücrede anormal nükleer ve kromatin morfolojisinin şekillenmesine neden olarak hücrenin yıkılmamasına neden olmaktadır (del Prete ve ark 2002). Sunulan bu çalışmada DNA ve RNA'da guanin hidroksilasyonunu göstermek amacıyla uygulanan 8-OHG immun boyanmasında Leptospirozlu hayvanların karaciğer ve böbrek dokularında yoğun immunreaktivite tespit edildi. Karaciğerde vena sentralislerin çevresindeki hepatositlerde, daha çok çekirdekte ve/veya sitoplazmada, portal bölgeye yakın hepatositlerde ise çoğunlukla sitoplazmada, böbreklerde de tubul epitellerinin sitoplazmalarında yoğun ve az sayıda hücrenin de çekirdeklerinde immun boyanmaların gözlenmesi bu iki organ arasında oluşan hasar derecelerinin farklılığını yansıtmaktadır.

Sonuç olarak Leptospira spp. ile doğal enfekte sığırlarda hastalığın patogenezinde oksidatif hasarın etkin bir rol oynadığı, hasara uğramış hücrelerde protein yıkılmamasının ubiquitin aracılığıyla yürütüldüğü ve DNA ile RNA'da oksidatif hidroksilasyonun şekillendiği ortaya konuldu.

► Öneriler

Karaciğer ve böbrek dokularında 8-OHG için yapılan immun boyamalarda gözlenen immunreaktivite farklılıkları, Leptospirozun patogenezinde oksidatif stre-

sin dışında başka mekanizmaların da bulunabileceğini düşündürmekte, bu nedenle daha ileri ve ayrıntılı çalışmaların gerekliliği tavsiye edilmektedir.

► Kaynaklar

- Barnett JK, Barnett D, Bolin CA, Summers TA, Wagar EA, Cheville NF, Hartskeerl RA, Haake DA, 1999. Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. *Infect Immun*, 67, 853-861.
- Baumeister W, Walz J, Zühl F, Seemüller E, 1998. The proteasome: paradigm of a self compartmentalizing protease. *Cell*, 92, 367-380.
- Bulu AA, Dörterler R, Özkan Ö, Hoştürk F, 1990. Doğu Anadolu'nun bazı illerinde (Kars, Artvin, Gümüşhane, Erzurum) sığır ve koyunlarda Leptospirozis vakaları üzerine araştırma. *Etlik Vet Mikrob Derg*, 6, 49-60.
- Cadima-Couto I, Freitas-Vieira A, Nowarski R, Britan-Rosich E, Kotler M, Goncalves J, 2009. Ubiquitin-fusion as a strategy to modulate protein half-life: A3G antiviral activity revisited. *Virology*, 393, 286-294.
- Çetinkaya B, Ertaş HB, Muz A, Öngör H, Kalender H, Özdemir V, 1999. Elazığ ilinde sığırlarda Leptospirozis'in seroprevalansının saptanması. *Türk J Vet Anim Sci*, 23, 633-639.
- da Silva FG, de Freitas JC, Anzai EK, Hashimoto VY, Giraldo N, Delbem ACB, Bracarense APFRL, dos Reis ACF, Vasconcellos SA, 2005. Leptospires detection in kidney, liver and uterus of cows slaughtered in Parana State, Brazil. *Braz J Microbiol*, 36, 38-42.
- del Prete MJ, Robles MS, Guao A, Martinez AC, Izquierdo M, Garcia-Sanz JA, 2002. Degradation of cellular mRNA is a general early apoptosis-induced event. *FASEB J*, 16, 2003-2005.
- Dutta TK, Christopher M, 2005. Leptospirosis-an overview. *JAPI*, 53, 545-551.
- Ellis WA, 1984. Bovine Leptospirosis in the tropics: Prevalence, pathogenesis and control. *Prev Vet Med*, 2, 411-421.
- Erdogan HM, Karapehlivan M, Cital M, Atakisi O, Uzlu E, Unver A, 2008. Serum sialic acid and oxidative stress parameters changes in cattle with Leptospirosis. *Vet Res Commun*, 32, 333-339.
- Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS, 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res*, 567, 1-61.
- Fiala ES, Conaway CC, Mathis JE, 1989. Oxidative DNA and RNA damage in the livers of Sprague-Dawley rats treated with the hepatocarcinogen 2-nitropropane. *Cancer Res*, 49, 5518-5522.
- Kasai H, Chung MH, Jones DS, Inoue H, Ishikawa H, Kamiya H, Ohtsuka E, Nishimura S, 1991. 8-Hydroxyguanine, a DNA adduct formed by oxygen radicals: its implication on oxygen radical-involved mutagenesis/carcinogenesis. *J Toxicol Sci*, 16, Suppl 1, 95-105.
- Langoni H, de Souza LC, da Silva VA, Luvizotto MC, Paes AC, Luchis SB, 1999. Incidence of leptospiral abortion in Brazilian dairy cattle. *Prev Vet Med*, 40, 271-275.
- Lee SH, Kim KA, Park YG, Seong IW, Kim MJ, Lee YJ, 2000. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar lai. *Gene*, 254, 19-28.
- Lomar AV, Diament D, Torres JR, 2000. Leptospirosis in Latin America. *Infect Dis Clin North Am*, 14, 23-39.
- Michel V, Branger C, Andre-Fontaine G, 2002. Epidemiology of leptospirosis. *Rev Cubana Med Trop*, 54, 7-10.
- Nordberg J, Arner ES, 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*, 31, 1287-312.
- Pirim İ, Gümüştekin K, Şahin YN, 2000. Serum ubiquitin concentration in patients with acute myocardial infarction. *T Klin J Med Res*, 18, 1-5.
- Plank R, Dean D, 2000. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes Infect*, 2, 1265-1276.
- Roy MD, 2007. Approach for assessing total cellular DNA damage. *Biotechniques*, 4, 425-435.
- Selvarajah J, Moumen A, 2010. Role of ubiquitination in the DNA damage response: proteomic analysis to identify new DNA-damage-induced ubiquitinated proteins. *Biochem Soc Trans*, 38, 87-91.
- Shan X, Chang Y, Lin CL, 2007. Messenger RNA oxidation is an early event preceding cell death and causes reduced protein expression. *FASEB J*, 21, 2753-2764.
- Sitprija V, Pipatanagul V, Mertowidjojo K, Boonpucknavig V, Boonpucknavig S, 1980. Pathogenesis of renal disease in Leptospirosis: Clinical and experimental studies. *Kidney Int*, 17, 827-836.
- Skilbeck NW, Forsyth WM, Dohnt M, 1988. Bovine leptospirosis: Microbiological and histological findings in cattle at slaughter. *Aust Vet J*, 65, 73-75.
- Spichler A, Ko AI, Silva EF, de Brito T, Silva AM, Athanazio D, Silva C, Seguro A, 2007. Reversal of renal tubule transporter downregulation during severe Leptospirosis with antimicrobial therapy. *Am J Trop Med Hyg*, 77, 1111-1119.
- Şahin M, Aydin F, Özdemir V, Genç O, Güler MA, 2002. Kars ve Ardahan illerinde sığır leptospirozisinin serolojik yöntemlerle araştırılması. *Türk J Vet Anim Sci*, 26, 17-25.
- Thompson JC, Manktelow BW, 1989. Pathogenesis of renal lesions in haemoglobinaemic and non-haemoglobinaemic leptospirosis. *J Comp Path*, 101, 201-214.
- Tuncel E, Ögütman R, 1975. Erzurum ve çevresinde Leptospirozis üzerinde çalışmalar. *Türk Hij Tec Biyo Derg*, 34, 101-121.
- Wamer WG, Wei RR, 1997. In vitro photooxidation of nucleic acids by ultraviolet A radiation. *Photochem Photobiol*, 6, 560-563.
- Wamer WG, Yin JJ, Wei RR, 1997. Oxidative damage to nucleic acids photosensitized by titanium dioxide. *Free Radical Biol Med*, 23, 851-858.
- World Health Organization, 1999. Leptospirosis worldwide, 1999. *Wkly Epidemiol Rec*, 74, 237-242.
- Yamao F, 1999. Ubiquitin system: Selectivity and timing of protein destruction. *J Biochem*, 125, 223-229.
- Yang CW, Wu MS, Pan MJ, 2001. Leptospirosis renal diseases. *Nephrol Dial Transplant*, 16 Suppl 5, 73-77.
- Yener Z, Keleş İ, 2001. Sığırlarda Leptospirozis üzerinde klinik ve patolojik incelemeler. *Vet Bil Derg*, 17, 21-26.