



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**ANAPLASMOSİSLİ KEÇİLERDE ERİTROSİT MEMBRANI LİPİT VE
PROTEİN OKSİDASYONU İLE Na^+/K^+ ATPAZ AKTİVİTESİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Hemşire Salim İLKAYA
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Yeter DEĞER

İKİNCİ DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Bekir OĞUZ

VAN-2019

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANAPLASMOSİSLİ KEÇİLERDE ERİTROSİT MEMBRANI LİPİT VE
PROTEİN OKSİDASYONU İLE Na^+/K^+ ATPAZ AKTİVİTESİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Hemşire Salim İLKAYA
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Yeter DEĞER

İKİNCİ DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Bekir OĞUZ


VAN-2019

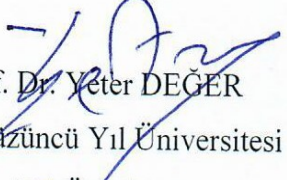
Bu araştırma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından TYL-2018-7273 nolu proje olarak desteklenmiştir.

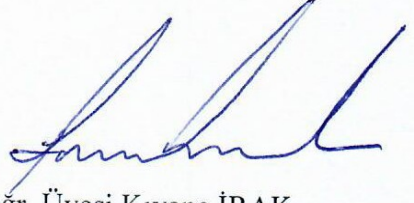
KABUL VE ONAY

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Fakültesi Anabilim Dalı'nda Hemşire Salim İLKAYA tarafından hazırlanan "Anaplasmosisli Keçilerde Eritrosit Membranı Lipit ve Protein Oksidasyonu ile Na⁺/K⁺ATPaz Aktivitesinin Araştırılması" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.


Tez Savunma Tarihi: 09 / 07/ 2019


Prof. Dr. Nihat MERZ
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Yeter DEĞER
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Jüri Üyesi


Dr. Öğr. Üyesi Kıvanç İRAK
Siirt Üniversitesi
Jüri Üyesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.


Prof. Dr. Semihâ DEDE
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Anaplasmosisli Keçilerde Eritrosit Membranı Lipit ve Protein Oksidasyonu ile Na^+/K^+ ATPaz Aktivitesinin Araştırılması” başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Salim İLKAYA

Tarih: 28/ 06/ 2019

TEŐEKKÖR

Tez çalıőmam sırasında yol gōsteren ve tezin yapılmasında bŸyŸk katkıları olan Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Yeter DEĞER'e ve ikinci danışmanım Dr. ŐĐr. Ÿyesi Bekir OĞUZ'a Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Nihat MERT'e, Anabilim Dalı'mızın değerli ŐĐretim Ÿyeleri Sayın Prof. Dr. Prof. Dr. Semiha DEDE'ye ve Prof. Dr. Handan MERT'e, laboratuvar aőamasındaki yardımlarından dolayı Dr. ŐĐr. Ÿyesi UĞur ŐZDEK'e, çalıőmama maddi destek veren YŸzŸncŸ Yıl Ÿniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Başkanlığı'na ve beni bu gŸnlere getiren aileme teőekkŸrlerimi sunarım.

Salim İLKAYA

ÖZET

İlkaya S. Anaplasmosisli Keçilerde Eritrosit Membranı Lipit ve Protein Oksidasyonu ile Na⁺/K⁺ATPaz Aktivitesinin Araştırılması. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veterinerlik Fakültesi, Biyokimya Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2019. Bu çalışma, keçilerde anaplasmosisin eritrosit membranı malondialdehit (MDA), ileri oksidasyon protein ürünleri (AOPP), Na⁺/K⁺ATPaz, hematolojik ve biyokimyasal parametreler üzerindeki etkisini değerlendirmek için yapıldı. Antikoagülanlı kan örneklerinde hematolojik parametreler kansayım cihazında ve serum örneklerinde biyokimyasal parametreler modüler oto analizör cihazında ticari kit kullanılarak ölçüldü. Eritrosit membranında MDA ve AOPP düzeyleri spektrofotometrik metotlar ile spektrofotometre cihazında, Na⁺/K⁺ATPaz aktivitesi ise ticari kiti kullanılarak ELISA cihazında ölçüldü. Hematolojik analiz sonuçları, anaplasmosis ile enfekte keçilerde RBC, Hb, Hct, MCV, MCH ve MCHC değerlerinde belirgin bir azalma, WBC degerinde ise artış olduğu ortaya koydu. Biyokimyasal analiz sonuçları, anaplasmosis ile enfekte keçilerde, AST, ALT, GGT aktivitelerinin ve globulin, totalbilirubin, direkt bilirubin, trigliserit ve demir seviyelerinde belirgin bir artış olduğunu, total protein, albumin, total kolesterol ve TDBK seviyelerinde ise önemli bir azalma olduğunu ortaya koydu. Anaplasmosisli keçilerde eritrosit membranı MDA ve AOPP seviyelerinin önem gösterecek şekilde artarken, Na⁺/K⁺ATPaz aktivesinin azaldığı belirlendi. Elde edilen sonuçlar, hematolojik ve biyokimyasal parametrelerde önemli değişiklikler olduğunu, aneminin ve oksidatif stresin ruminantlarda anaplasmosisin ortak bir komplikasyonu olduğunu, ayrıca MDA, AOPP düzeylerinin ve Na⁺/K⁺ATPaz aktivitesinin belirlenmesinin hastalığın prognozunun takip edilmesinde faydalı olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Anaplasmosis, AOPP, keçi, MDA, Na⁺/K⁺ATPaz

ABSTRACT

İlkaya S. The Investigation of Erythrocyte Membrane Lipid and Protein Oxidation with Na⁺/K⁺ATPase Activity In Goats Anaplasmosis. Van Yüzüncü Yıl University, Institute of Health Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Master Thesis, Van, 2019.

This study was carried out to evaluate the effect of anaplasmosis on erythrocyte membrane malondialdehyde (MDA), advanced oxidation protein products (AOPP), Na⁺/K⁺ATPase, hematological and biochemical parameters in goats. Hematological parameters in anticoagulant blood samples on blood cell counter and biochemical parameters in serum on modular auto analyzer were measured using commercial kit. In addition, MDA and AOPP levels were determined in spectrophotometre by spectrophotometric methods and Na⁺/K⁺ATPase activity was determined in ELISA by using commercial ELISA kit in erythrocyte membrane. Results of hematological analysis revealed that anaplasmosis-infected goats, RBC, Hb, Hct, MCV, MCH and MCHC values were decreased significantly, but WBC value was increased significantly. Results of biochemical analysis revealed that anaplasmosis-infected goats, AST, ALT, GGT activities and globulin, total lbilirubin, direct bilirubin, triglyceride and iron levels increased significantly, total protein, albumin and total cholesterol and TIBC levels decreased significantly. It was found that erythrocyte membrane MDA and AOPP levels increased significantly, while Na⁺/K⁺ATPase activity decreased in goats with anaplasmosis. The results show that there are significant changes in hematological and biochemical parameters, anemia and oxidative stres are common complication of anaplasmosis in ruminants, as well as determination of MDA, AOPP levels and Na⁺/K⁺ATPase activity may be useful in monitoring the prognosis of the disease.

Keywords: Anaplasmosis, AOPP, goat, MDA, Na⁺/K⁺ATPase

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	II
Etik Beyan.....	III
Teşekkür.....	IV
Özet.....	V
Abstract.....	VI
İçindekiler.....	VII
Simgeler ve Kısaltmalar.....	IX
Şekiller Listesi.....	X
Tablolar Listesi.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Anaplasmosis.....	2
2.1.1. Morfoloji.....	2
2.1.2. Hastalık etkeninin yaşam döngüsü.....	3
2.1.3. Patojenite.....	3
2.1.4. Klinik belirtiler.....	4
2.1.5. Etiyoloji ve ayırıcı tanı.....	5
2.1.6. Tedavi ve korunma.....	5
2.2. Biyokimyasal Parametreler.....	6
2.3. Hematolojik Parametreler.....	7
2.4. Eritrositler.....	7
2.4.1. Eritrosit membranı.....	8
2.4.2. Eritrosit membran lipidleri.....	9
2.4.3. Eritrosit membran proteinleri.....	9
2.4.4. Na ⁺ /K ⁺ ATPaz.....	10
2.5. Antioksidan Sistem.....	10
2.5.1. Protein oksidasyonu.....	11

2.5.2. Lipid peroksidasyonu.....	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1. Gereç.....	13
3.1.1. Çalışma materyali.....	13
3.2. Yöntem.....	13
3.2.1. Hastaların değerlendirilmesi.....	13
3.2.2. Kan örneklerinin alınması.....	13
3.3. Parazitolojik Analiz	14
3.4. Hematolojik Analiz.....	14
3.5. Biyokimyasal Analiz	14
3.6. Eritrosit Membranının Elde Edilmesi.....	14
3.6.1. Eritrosit membranında MDA analizi.....	15
3.6.2. Eritrosit membranında AOPP analizi.....	17
3.6.3. Eritrosit membranında Na ⁺ /K ⁺ ATPaz analizi.....	19
3.6.4. Eritrosit membranında protein tayini.....	21
3.7. İstatistik Analiz.....	21
4. BULGULAR.....	22
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	28
KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ.....	41
EKLER.....	42
Ek 1. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu	42
Ek 2. Tez Orjinallik Raporu.....	43

SİMGELER VE KISALTMALAR

HCO	: Bikarbonat
SOD	: Süperoksit dismutaz
CAT	: Katalaz
GPX	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GST	: Glutasyon S-transferaz
G6PD	: Glukoz 6- fosfat dehidrogenaz
PCO	: Protein karbonil
P-SH	: Protein tiyol
NT	: Nitrotirozin
AOPP	: İleri oksidasyon protein ürünleri
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asitleri
HNE	: 4-Hidroksinonenal
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TCA	: Triklor asetik asit
KI	: Potasyum iyodür
PBS	: Phosphate buffered saline
Na₂HPO₄	: Disodyum hidrojen fosfat
KH₂PO₄	: Potasyum di-hidrojen fosfat
MDA	: Malondialdehit
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction)
RLB	: Reverse line blotting
NPP	: Yeni alım yolları (new permeation pathways)

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Eritrosit membranının yapısı.....	8
Şekil 2. MDA standart grafiği.....	17
Şekil 3. AOPP standart grafiği.....	19
Şekil 4. N^+/K^+ ATPaz standart grafiği.....	20
Şekil 5. Kan frotilerinde Anaplasma türlerinin eritrosit içindeki görünümü.....	22
Şekil 6. Anaplasma türleri yönünden seropozitif ve seronegatif kan serumlarının ELISA pleytindeki görünümü.....	23
Şekil 7. Sağlıklı ve anaplasmosisli keçilerde eritrosit membranı MDA düzeyi	26
Şekil 8. Sağlıklı ve anaplasmosisli keçilerde eritrosit membranı AOPP düzeyi	27
Şekil 9. Sağlıklı ve anaplasmosisli keçilerde eritrosit membranı N^+/K^+ ATPaz aktivitesi	27

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Sağlıklı ve anaplasmosisli keçilerde hematolojik parametreler	24
Tablo 2. Sağlıklı ve anaplasmosisli keçilerde biyokimyasal parametreler	25
Tablo 3. Sağlıklı ve anaplasmosisli keçilerde eritrosit membranı MDA, AOPP düzeyleri ve Na ⁺ /K ⁺ ATPaz aktivitesi.....	26



1.GİRİŞ

Anaplasma türlerinin meydana getirdiği anaplasmosis, beslenme koşullarının yetersiz olduğu tropik ve subtropik iklim bölgelerinde et, yapağı ve süt üretiminde belirgin kayıplara sebep olan enfeksiyöz bir hastalıktır. Anaplasma etkenleri konakçıların eritrositlerinin içine ve çevresine yakın yerleşim gösteren, 0.3-1 mikron büyüklükte nokta şeklinde sitoplazmasız organizmalardır. Koyun ve keçi anaplasmosisi genellikle *Anaplasma ovis* ve *A. phagocytophilum* ile ilişkilendirilir ve bu hastalık çeşitli kene türleri (*Boophilus spp.*, *Rhipicephalus spp.*, *Hyalomma spp.*, *Ixodes spp.* ve *Dermocentor spp.*) ile biyolojik olarak, bazı diptera (*Tabanid spp.*, *Stomoxys spp.* ve *Melophagus ovinus*) türleri ile mekanik yolla nakledilir.

Bu hastalığın Dünya'daki durumuna bakıldığında Amerika, Afrika, Avustralya, Uzak Doğu ve Akdeniz ülkelerini de içine alan tropik ve subtropik iklim bölgelerinde endemik olduğu görülmektedir. Hastalığın klinik belirtileri, enfekte hayvanın genel durumuna, ırkına ve yaşına bağlı olarak değişir. Koyun ve keçilerde akut anaplasmosis genel depresyon, uyuşukluk ve 40-41°C ateş ile başlamakta, süt veriminde hızla düşüş ile birlikte, kilo kaybı, ilerleyen anemi, dehidrasyon ve sarılık ile ortaya çıkmaktadır.

Anaplasmosiste hem hücrel hem de humoral bağışıklık meydana gelmektedir. Hayvanlar hastalığa karşı uzun süre bağışıklık kazandığı için hastalığın tedavisi güçtür. Bağışıklık daha çok preüminisyona bağlı gelişmektedir.

Paraziter enfeksiyonların patogeneğinde reaktif oksijen türlerinin etkisi son yıllarda aktif bir araştırma alanı olmuştur. Ek olarak, mikroorganizmaları öldüren hücrel savunmanın mekanizmaları da yoğun araştırmalara konu olmuştur. Aslında, anaplasmosisin oksidatif belirteçler ve antioksidanlar üzerindeki etkilerini belirleyen bazı çalışmalar vardır, ancak Anaplasma türleri ile enfekte olmuş keçilerde eritrosit membranı lipid peroksidasyonu (MDA), ileri oksidasyon protein ürünleri (AOPP) ve Na⁺/K⁺ATPaz ile ilgili bir rapor bulunamamıştır. Bu çalışma keçilerde anaplasmosisin eritrosit membranı MDA, AOPP, Na⁺/K⁺ATPaz, hematolojik ve biyokimyasal parametreler üzerindeki etkisini değerlendirmek için yapıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Anaplasmosis

Anaplasmosis, anaplasma soyuna bağılı çeşitli türlerin neden olduğu, tropik ve subtropik bölgelerde yabani ve evcil hayvanlarda yaygın olarak görülen enfeksiyonel bir hastalıktır.

Anaplasma türleri zorunlu hücre içi parazitleridir. Anaplasma türleri konaklarında farklı hücreleri enfekte ederler. *A. marginale*, *A. centrale* ve *A. Ovis* ruminantların eritrositlerinde parazitofor vakuol içinde, *A. platys* köpeklerin trombositlerine, *A. phagocytophilum* ise insan ve evcil hayvanların nötrofil veya eozonofillerinin sitoplazması içerisine yerleşir (Dumler, 2005; Ekici, 2016).

Son yıllarda *A. marginale*, *A. ovis* ve *A. phagocytophilum* gibi türlerin önemi artmıştır. Çiftlik hayvanlarında ve insanlarda bu etkenlerin patojenik aktiviteleri birbirleri ile benzerlik göstermektedir. Dünyada yaygın olarak bulunan *Ixodes*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ornithodoros* ve *Amblyomma* cinslerine ait kene türleri Anaplasma türlerinin naklinde rol oynamaktadır (Dumanlı ve ark., 2012; Öter ve ark., 2016).

Anaplasmosis, Dünya'da birçok ülkede koyun ve keçi yetiştiriciliğı yapılan, daha çok bakım ve besleme koşullarının yetersiz olduğu tropik ve subtropik bölgelerde et, yapağı ve süt üretiminde belirgin kayıplara sebep olan bir hastalık olarak önemini korumaktadır (Rymaszewska ve Grenda, 2008; Şaki ve Özer, 2010).

2.1.1. Morfoloji

Anaplasma türleri omurgalı konak hücrelerinde membranla çevrilmiş intrasitoplazmik bir vakuol içinde gelişirler. Eritrositlerde bulunan türler (*A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis*) küçük ve koyu bir nokta şeklinde görünürken; granülosit (*A. phagocytophilum*, *A. bovis*) ve trombositlerde (*A. platys*) bulunan türler çok sayıda

bireysel organizma içeren yoğun veya gevşek yapılı inklüzyonlar şeklinde görünürler (Ekici, 2016).

Enfekte hücrelerde birden fazla inklüzyon bulunabilir. Bu inklüzyonlar dut benzeri görünümünden dolayı “morula” olarak da adlandırılırlar. inklüzyon cisimlerini oluşturan bireysel organizmalar pleomorfik, yuvarlak veya oval yapıda, 0.3-0.4 mikron çapındadır. Inklüzyonların çapı ise 4.0-6.0 mikrona kadar çıkabilir. *Romanowsky* metotlarıyla mavimsi pembe renge boyanırlar (Dumler ve ark., 2005).

2.1.2. Hastalık etkeninin yaşam döngüsü

Anaplasma türlerinin yaşam siklusu, vektör kene türü ve konak omurgalı hayvan arasında geçmektedir. Keneler ile biyolojik olarak nakledilirken, sinek sokması (*Melophagus ovinus*, *Tabanus* ve *Psorophora* cinsindeki sinekler) ve kontamine cerrahi aletler de mekanik olarak bulaşabilir. *Anaplasma ovis*'in esas biyolojik vektörleri *Dermacentor* ve *Rhipicephalus* soyunda bulunan kene türleri olup, *Anaplasma phagocytophilum* ise Amerika'da *Ixodes ricinus* ile transstadial olarak taşınmakta ve bulaştırılmaktadır (Alessandra ve Caracappa, 2012).

Vektör kene türleri Anaplasma etkenlerini transovarial (yumurtadan kenenin yeni nesillerine) nakilden daha çok transstadial (larvadan nimfe, nimfden ergine) olarak nakletmektedir. Vektör kene türleri, enfekte konak üzerinde beslenirken, kan ile birlikte alınan etkenler ilk olarak kenenin barsak epitel hücrelerine girmekte ve burada birinci üreme dönemi geçmektedir (Alessandra ve Caracappa, 2012). Daha sonra etkenler kenenin tükürük bezindeki epitel hücrelerine girerek, ikinci bir üreme dönemi geçirmekte ve vektör kene konak hayvandan (koyun ve keçi gibi) beslenmek için kan emerken, tükürük bezi salgısı içinde omurgalı konağa Anaplasma etkenleri verilmekte ve böylece anaplasmosise neden olmaktadır (Taylor ve ark., 2007; Rar ve Golovljova, 2011).

Omurgalı konakta *A. ovis* eritrositlerde parazitlenirken, *A. Phagocytophilum* nötrofil, eozinofil ve monositlerde bulunmakta, koyun ve keçilerde parazitemi en yüksek düzeye ulaştığında, granülositlerin % 90'ından fazlasını enfekte edebilmektedir (Woldehiwet, 2010).

2.1.3. Patojenite

Anaplasmosiste patolojik belirtiler, kaşeksi ve ölüm ile sonuçlanan ilerleyici hemolitik anemi şeklinde ortaya çıkmaktadır. *A. ovis* ile enfekte keçilerde hematokrit, eritrosit ve hemoglobin konsantrasyonlarının enfekte olmayan keçilere göre belirgin bir şekilde azaldığı görülmektedir (Dumler, 2005).

Anaplasmosiste meydana gelen anemi parazitli eritrositlerin ekstrasvasküler yıkımından kaynaklanmakta ve dalak ile kemik iliğindeki eritrositlerde fagositosis de görülebilmektedir. *A. ovis* enfeksiyonlarında anemi şiddetli seyretmekte ve eritrositlerin % 60- 65 kaybı ile sonuçlanmaktadır. Bu durumun parazitli eritrositler yanında parazitli olmayan eritrositlerin de bağışıklık kaynaklı yıkımından (fagositosis gibi) kaynaklandığı düşünülmektedir (Ahmadi-hamedani ve ark., 2012).

Diğer yandan, koyunlarda anaplasmosis genellikle hafif seyreden bir enfeksiyon olmakla birlikte, predispoze faktörlerin latent enfeksiyonları akut hale dönüştürebileceği, bu durumda da klinik tablonun kötüleşebileceği kaydedilmiştir (Hornok ve ark., 2007). Yine *A. phagocytophilum* ile enfekte koyunlarda erken lenfositopeni ortaya çıkmakta, bunu uzamış nötropeni ve trombositopeniye bağlı şiddetli lökopeni tablosu izlemektedir (Dumler ve ark., 2001). Bu durumda enfekte koyunlarda, ateşli dönem ve bakteriyemi süresince kandaki nötrofillerin sayısı belirgin olarak azalmakta ve bu azalma bakteriyemi sonrası bir süre daha devam etmektedir (Woldehiwet, 2010).

A. phagocytophilum, *A. ovis*, 0.14-0.20 mikron büyüklüğünde olup, sadece eritrositlerde parazitofor vakuol içinde yer almaktadır (Talat ve ark., 2005). Anaplasma türleri morfolojik olarak birbirlerinden ayırt edilememekte, ancak parazitin eritrosit içinde kenar ya da merkezde yerleşmesi, ayırıcı bir özellik olarak kabul edilmektedir (Woldehiwet, 2010).

2.1.4. Klinik belirtiler

Anaplasmosiste hastalığın şiddeti koyun ve keçilerin yaşları ile ters orantılıdır. Oğlak ve kuzularda enfeksiyon hafif seyirli ve ölüm oranı da çok düşüktür. Bir yaşına kadarki dönemde ise, hastalık daha şiddetli seyretmekte ancak, bu hayvanların çoğu iyileşmektedir. Erginlerde ise ağır bir enfeksiyon tablosu ortaya çıkmakta, şiddetli

anemi sonucu ölüm oranının % 50'ye kadar çıkabildiği görülmektedir (Alessandra ve Caracappa, 2012).

Anaplasmosis koyun ve keçilerde daha çok hemolitik anemi ile seyretmektedir. Koyunlarda enfeksiyon genellikle subklinik seyirli iken, keçilerde daha patojen bir seyir gösterdiği belirtilmiştir (Stuen ve Longbottom, 2011; Ahmadi-hamedani ve ark., 2012). Keçilerde akut enfeksiyon esnasında; depresyon, halsizlik, zayıflama, ateş, ilerleyici anemi ve süt veriminde azalma görüldüğü bildirilmiştir (Rymaszewska ve Grenda, 2008).

Anaplasmosiste eritrofagositosisden dolayı hemoglobinuri görülmezken, yaygın hemolitik anemi dikkati çekmektedir. *A. ovis* enfeksiyonları, keçilerde koyunlardan daha şiddetli seyretmektedir (Stuen ve Longbottom, 2011; Ahmadi-hamedani ve ark., 2012). Hastalık genel depresyon, uyuşukluk ve 40-41°C ateş ile başlamakta, süt veriminde hızlı düşüş ile birlikte, kilo kaybı, ilerleyen anemi, dehidrasyon ve sarılık ortaya çıkmaktadır. Hastalıktan etkilenen hayvanlar hareket ettirildiklerinde hipoksi sebebi ile ölmektedirler. İyileşen hayvanlar hayatları boyunca taşıyıcı olarak kalmakta ve hastalığın endemik olduğu bölgelerde önemli kayıplara neden olmaktadır (Alessandra ve Caracappa, 2012).

2.1.5. Etiyoloji ve ayırıcı tanı

Endemik bölgelerde hemoglobinuri belirtisi göstermeyen kronik anemili ve kaşektik hayvanlar anaplasmosisten şüphe ettirir. Bu hastalıkta sarılık önemli bir belirti olup, Giemsa boyalı sürme kan frotilerinde anaplasma inkluzyonlarının görülmesi teşhisi kuvvetlendirmektedir. Teşhis amacıyla, bazı serolojik testler ve özellikle son yıllarda PCR ve RLB gibi moleküler yöntemler de kullanılmaktadır. Anaplasmosis, başta leptospirosis ve theileriosis olmak üzere anemi ve sarılıkla seyreden antraks, hemorajik septisemi, akut trypanosomiasis ve akut babesiosis gibi hastalıklarla karıştırılabilmektedir (Alessandra ve Caracappa, 2012).

2.1.6. Tedavi ve Korunma

Anaplasmosisin etiyolojik tedavisinde ve akut enfeksiyonlarda tetrasiklinler etkili ilaç seçenekleridir. Bu ilaçlar özellikle klinik semptomların tam olarak ortaya

çıkmadığı, enfeksiyonun başlangıç aşamasında kullanıldıklarında yüksek düzeyde etkili olmaktadır (Ekici, 2016).

Tedavi amacı ile oksitetrasiklin 5-10 mg i.m. veya i.v. ve klortetrasiklin 1.5 mg/kg p.o. yolla kullanılmaktadır. Diğer taraftan babesiosis tedavisinde kullanılan imidocarb dipropionatın da 1.2-2.4 mg/kg dozda kullanıldığında Anaplasma enfeksiyonlarında etkili olduğu bulunmuştur. Enfeksiyonun destekleyici tedavisinde hipoksiye karşı kan nakli yapılması, dehidrasyona karşı sıvı tedavisi uygulanması ve hayvanların temiz ve havadar bir yerde barındırılması önerilmektedir (Eren ve Karagenç, 2010).

Enfeksiyonun korunma ve kontrolündeki ana strateji, koyun ve keçilerde kene enfestasyonlarının azaltılmasına dayandırılmalıdır. Özellikle sentetik pretroidler kullanılarak düzenli kene mücadelesi yapılması ile koyun ve özellikle yavru kayıplarının önüne geçilebilmektedir. Bununla birlikte hayvanların otlaklara çıkarılmadan önce profilaksi amacıyla uzun etkili tetrasiklin antibiyotik kullanımı da koruma sağlayabilmektedir (Woldehiwet, 2010; Stuen ve Longbottom, 2011).

2.2. Biyokimyasal Parametreler

Biyokimyasal parametreler, hastalığın tanısında ve seyrinde, uygun bir tedavi şeklinin belirlenmesinde uygulanan tedaviye cevabın veya komplikasyonun takibinde kullanılır. Bu amaçla kullanılan biyolojik moleküller genellikle dört grupta incelenir. Bunlar; metabolik aktivite sonucu oluşan moleküller (üre kreatinin, glikoz, bilirubin, kolesterol vb.), enzimler (ALT, AST, GGT, CK, CK-MB vb.), mineral iyonlar ve gazlar (Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , CO_2 , vb.), vitaminler (vitamin A, C, D, folik asit vb.), hormonlar (T3, T4, TSH vb.) ve diğerleri. Metabolik aktivite sonucu oluşan moleküllerin analizi; metabolizmanın aktivitesi hakkında bilgi verir. Bunların konsantrasyonu serum veya plazmanın g/dL yada g/L düzeyindedir. Bu analizler klinik biyokimyasal analizlerin yaklaşık % 60'ını oluşturur. Enzimler; normal olarak hücre içi protein molekülü olan enzimlerin kanda yüksek düzeyleri genel olarak hücre yıkımını ifade eder. Bu analizler tüm klinik biyokimyasal analizlerin yaklaşık % 30'unu oluşturur. Mineral iyonlar ve gazlar; vücut sıvıları ve dokularının ozmotik basıncından ve asit baz dengesinden sorumlu moleküllerdir. Vitaminler ve hormonlar; vücut sıvılarında ve dokularında az

miktarda bulunan moleküllerdir, ancak üstlendikleri görev son derece önemlidir. Mineral iyonlar ve gazlarla birlikte klinik biyokimyasal analizlerin % 10'unu oluştururlar (Karagül ve ark., 2000; Mehmetoğlu, 2002).

2.3. Hematolojik Parametreler

Kan, bütün canlılarda damar sistemi içinde dolaşan biyolojik bir sıvıdır. Kanın organizmada taşıma, düzenleme, savunma ve korunma işlevleri vardır. Kan hücresel elementler (eritrositler, lökositler ve trombositler) ve sıvı kısımdan (plazma veya serum) oluşur. Kanın sıvı kısmında su, organik ve inorganik maddeler yer alır (Yılmaz, 1984).

Hematolojik tahliller, genel sağlık durumunu belirlemek için; anemi, enfeksiyon, inflamasyon gibi kan hücrelerini etkileyen çeşitli hastalık ve durumları taramak, teşhis etmek veya izlemek için yapılır. Bu testler hemogram, sedimentasyon ve koagülasyon gibi testlerden oluşur. Kan sayımı (hemogram); kırmızı kan hücrelerinin (RBC, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC), beyaz kan hücrelerinin (WBC sayısı) ve trombositlerin değerlendirilmesidir (Yılmaz, 1984).

2.4. Eritrositler

Memelilerin kanındaki eritrositler çekirdeksiz ve hareketsiz hücrelerdir. Eritrositler 4-9 µm çapları olan bikonkav diskler şeklindedir. Keçi eritrositleri ise, çok küçük olduklarından bikonkavite azdır. Bikonkav şeklinde olmaları; büyük yüzey alanı/hacim oranı, minimum difüzyon mesafesi ve ozmotik değışikliklere dayanma kapasitesi sağlar. Dar yerlerden geçerken esnek yapısı avantaj oluşturur. Memeli eritrositlerinde çekirdek ve diğer organeller yoktur. Bunun sonucu, bölünme ve mitokondrial ATP oluşumu gözlemlenmez. Değışken sıcak kanlı hayvanların ve kanatlıların eritrositleri elips şeklinde olup çekirdeklidirler (Cicha ve ark., 2001).

Eritrositlerde subsellüler organeller bulunmadığından nükleik asit ve protein sentezleri gerçekleşmez, lipid metabolizması ise sınırlıdır. ADP, ATP ve NADP⁺ eritrositlerin önemli yapıtaşlarıdır (Shin ve ark., 2004)

Eritrositler hemoglobinin yapısındaki Fe⁺² formunun korunması, iyon dengesinin sağlanması, hemin ve diğer proteinlerin yapısında bulunan tiyol gruplarının oksidasyonunun engellenmesi, eritrosit membranının bütünlüğünün sağlanması için

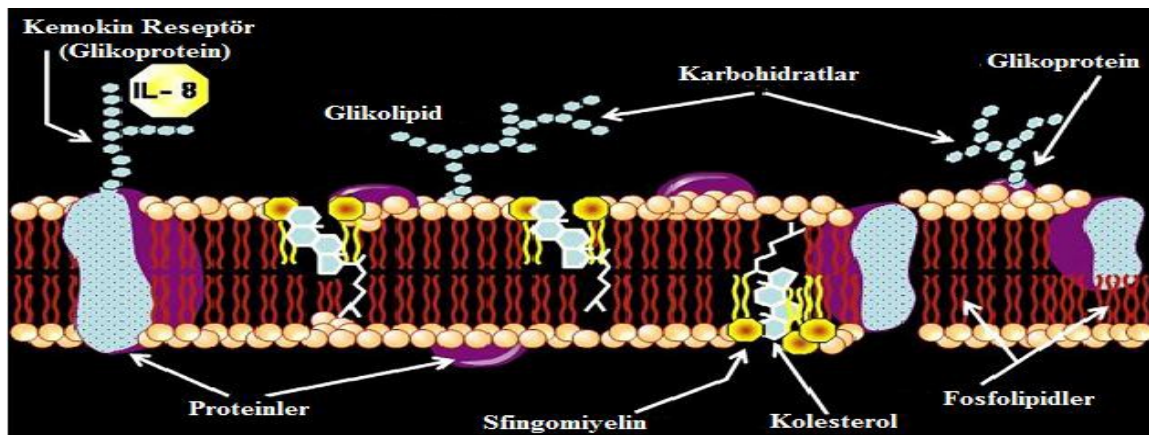
enerjiye ihtiyaç duyar. Gerekli enerji glukozun anaerobik glikoliz ve pentoz fosfat yolunda yıkılımı ile karşılanır (Halliwell ve Gutteridge, 2001; Shin ve ark., 2004).

2.4.1. Eritrosit membranı

İster prokaryotik ister ökaryotik olsun tüm hücreler, hücreyi sınırlayan ve hücre içeriğini çevre dokudan ayıran bir plazma membranı tarafından sarılmıştır. Moleküllerin geçişinde seçici bir bariyer olan plazma membranı, spesifik moleküllerin hücre içi veya dışına hareketini düzenleyerek sitoplazmanın kompozisyonunu belirler. Ayrıca membranın yapısındaki bazı proteinler hücreler arası etkileşimleri kontrol etme ve hücreye gelen çevresel sinyalleri alma fonksiyonlarını yürütür (Yenerel, 2004).

Eritrosit membranı hücre içi ile hücre dışı arasında iyon dengesini sağlayarak pH'nı sabit düzeyde tutulması, organik fosfatlar ve indirgenler gibi hayati önem taşıyan bileşiklerin korunması ve metabolik atıkların organizmadan uzaklaştırılması gibi önemli görevleri yerine getirir (Patrick ve ark., 2004). Bununla birlikte glikoliz enzimleri inaktive ederek eritrosit metabolizmasını düzenler (Sikorski ve ark., 2000).

Tüm biyolojik membranlar lipid ve protein molekülleri içerirler. Genel yapı, ince bir lipid tabakası (çift tabakalı) ve lipid tabakası içine gömülmüş protein molekülleri. Lipid-protein oranı membranlara göre değişkenlik gösterir. Lipidler membranın esas yapısal unsurlarıdır. Eritrosit membranda intrasellüler ve ekstrasellüler iyon dengesini sağlayan pompa sistemleri bulunur; bu pompa sistemleri, $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ ve $\text{Ca}^{+2}\text{ATPaz}$ gibi enzimler görev alır (Yenerel, 2004).



Şekil 1. Eritrosit membranın yapısı (Tziakas ve ark., 2010).

2.4.2. Eritrosit membran lipidleri

Biyolojik membranların üç major lipid komponenti, fosfolipitler, glikolipitler ve kolesteroldür. Memeli hücrelerinin plazma membranında fazla miktarda bulunan fosfolipitler; fosfatidilkolin, sfingomiyelin, fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamindir. Fosfolipitler membrana hareketlilik ve esneklik kazandırır. Aynı zamanda madde geçişini kontrol ederler. Glikolipitler yapıları gereği hücre yüzeyinde koruyucu bir tabaka oluştururlar. Hücre- hücre etkileşimlerinde ve hücreler arası tanımda rol oynarlar. Hayvan hücrelerinde kolesterol lipit çift tabakada fosfolipit molekülleri arasına yerleşmiştir. Kolesterol, membranlarda en sık raslanan steroldür. Plazma membranındaki kolesterolün tamamı serbestir ve membranının dış kısımlarına doğru bol miktarda bulunur. Kolesterolün membranlarda, membran akışkanlığını düzenlemek, sıvılığını belirlemek, dayanıklılık ve esnekliğini arttırmak gibi görevleri vardır (Krachler ve ark., 2008).

2.4.3. Eritrosit membran proteinleri

Eritrosit membranında küresel tanecikler şeklindedir. 12 major ve yüzlerce minor protein mevcuttur. Hücre membranında bulunan protein molekülleri zar yüzeyinde veya zara gömülmüş halde bulunurlar. Eritrosit membran proteinleri; integral proteinler ve periferik proteinler olmak üzere iki gruptur. İntegral proteinler, membranın çift katmanı boyunca asimetrik dağılım gösterirler ve hücre zarında bulunan lipitlerle bağlıdır. Hem hidrofilik hem de hidrofobik uçları vardır. Çoğunlukla globüler yapıdadırlar ve zarın her iki yüzeyine de uzanan uçlara sahiptirler. Hücre zarının yarı-geçirgenliğinde, hücre zarındaki proteinlerin hareket etmesini sağlarlar. İmmunoglobulin molekülleri ve pek çok hormon reseptör molekülleri integral proteinlerdir. Periferik proteinler, iki katlı lipid tabakasının yüzeyinde yer alırlar, zar yüzeyine, çoğu kez integral proteinlere iyonik bağlarla tutunurlar. Membran proteinlerinin taşıma, enzimatik aktivite, sinyal iletimi, hücreler arası bağlantı, hücrenin antijenik özelliklerinin sağlanması, hücre iskeleti ve dış matrikse bağlanma gibi değişik görevleri vardır (Altıntaş, 2006).

2.4.4. Na⁺/K⁺ ATPaz

Eritrosit iskeletini oluşturan proteinlerin yanında, eritrosit membranı enzim yapısında proteinler de içerir. Na⁺/K⁺ATPaz da bu proteinlerden birisidir (Fuller ve ark., 2012). Na⁺/K⁺ATPaz; tüm memeli hücrelerinin membranlarında bulunan ve Na⁺/K⁺ pompası veya Na⁺ pompası olarak da isimlendirilen bir integral membran proteindir. Hücre membranının iki tarafı arasında iyon dengesinin düzenlenmesi ve korunmasından sorumlu ana proteindir (Akbulut, 2008).

Na⁺/K⁺ATPaz ile 3 tane Na⁺ iyonu hücre dışına pompalanırken, buna karşılık 2 tane K⁺ iyonu hücre içine alınır. Bu transport hücre zarında hem kimyasal hem de elektriksel bir gradyan oluşturur. Bu olay esnasında bir ATP hidroliz edilir. Dinlenme halindeki bir insanda kullanılan ATP'nin yaklaşık olarak % 23'ünün Na⁺/K⁺ATPaz tarafından tüketildiği tahmin edilmektedir (Nikolic ve ark., 2004).

2.5. Antioksidan Sistem

Serbest radikaller, orbitallerinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron barındıran moleküllerdir. Serbest radikaller eşlenmemiş elektron bulundurmalarından dolayı diğer maddelerle kolaylıkla reaksiyona girerler. Serbest radikaller oksijen ve nitrojen kaynaklı olabilir. Oksijen kaynaklı olanlar reaktif oksijen türleri (ROS) ve nitrojen kaynaklı olanlar reaktif nitrojen türleri (RNS) olarak adlandırılır. ROS organizmada hem endojen hem de eksojen kaynaklar tarafından meydana getirilebilir (Valko ve ark., 2007).

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önleyen antioksidan savunma sistemleri vardır. Antioksidanlar serbest radikalleri temizleyen ve hücre hasarını engelleyen maddelerdir. Antioksidanlar enzimatik olan ve olmayan olmak üzere iki gruba ayrılır. Glutasyon, vitamin C, ürik asit, bilirubin, albümin veseruloplazmin enzimsel olmayan antioksidanlar arasında sayılabilir. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutasyon peroksidaz (GPx), glutasyon redüktaz (GR), glutasyon S-transferaz (GST) ve glukoz 6- fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimsel antioksidanlardır (Karabulut ve Gülay, 2016).

Normal şartlar altında antioksidanlar ile serbest radikaller denge halindedir. Çeşitli etkilere bağlı olarak vucutta ROS miktarındaki artış veya antioksidanların azalmasına bağlı olarak oksidatif denge bozulur. ROS miktarındaki bu artış sonuçta, hücre membranlarında hasar, hücrede proteinlerin yapı ve fonksiyonlarında bozulma ve DNA'da yapısal hasar meydana getirerek, hücrede yapısal ve metabolik bozukluklara neden olurlar (Aygün, 2018).

2.5.1. Protein oksidasyonu

Oksidatif stres sonucunda oluşan ROS hücre membranındaki proteinler üzerinde oksidatif hasara neden olurlar. Proteinlerin oksidatif hasardan etkilenme dereceleri içerdikleri aminoasite bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren amino asitleri içeren proteinler ROS'dan daha kolay etkilenirler (Okur, 2008). Oksidatif stres sonucunda protein yapılarında meydana gelen oksidatif modifikasyonlar, hücre iskeletini oluşturan proteinlerde ve enzimlerde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere yol açar (Kayalı ve ark., 2003; Zengin ve ark., 2017).

Protein oksidasyonu, proteinlerin ROS veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyonu sonucu meydana gelir. Proteinlerde yapısal değişikliğe yol açan başlıca moleküler mekanizmalar protein karbonil (PCO) oluşumu ile karakterize edilen metal katalizli protein oksidasyonu, protein tiyol (P-SH) gruplarının kaybı, nitrotirozin (NT) ve ileri oksidasyon protein ürünleri (AOPP) oluşumu olarak gerçekleşir (Okur, 2008).

AOPP, ditirozin çapraz bağlı, disülfid köprülü ve protein karbonil içeren protein oksidasyon ürünleri olarak tanımlanır. AOPP proteinlerdeki kalıcı oksidatif hasarın göstergesi olarak kullanılır (Kayalı ve ark., 2003).

Yapılan bir çalışmada, AOPP'nin, MDA'dan daha duyarlı oksidatif stres belirteci olduğu, AOPP düzeylerinin, protein oksidasyonunun göstergesi olan plazma ditirozin ve ileri glikasyon son ürünü olan pentozidin düzeyleri ile korelasyon gösterdiği, bununla birlikte lipid peroksidasyon markırı olan maddelerle korelasyon göstermediği belirtilmiştir (Witko-Sarsat ve ark.,1996).

2.5.2. Lipid peroksidasyonu

Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Lipid peroksidasyonu enzim gerektirmeyen ve ileri safhalarında yeni serbest radikal oluşumunu ve/veya ara lipid hidroperoksit ürünlerinin meydana gelmesi ile karakterizedir. Lipit peroksidasyonunu, ROS'un biyolojik membranlarda bulunan poliansatüre yağ asitlerinde (PUFA) metilen karbon hidrojenine saldırısı ile başlar. Oluşan lipid radikali moleküler oksijen ile reaksiyona girerek peroksil radikalini meydana getirmek üzere değişime uğrar. Bu şekilde oksidan özellik kazanmış lipid molekülü antioksidanların durumuna göre diğer yağ asitlerine etki ederek, lipid hidroperoksitlerin oluşumuna aracılık eder. Bu süreç sonunda malondialdehit (MDA), 4-hidroksinonenal (HNE) gibi son derece toksik lipit peroksidasyon ürünleri meydana gelir (Okur, 2008).

Lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'nın, hücre membranının geçirgenliğini arttırdığı, membranların iyon alışverişine etki ederek hücre içi iyon dengesini bozduğu, enzim aktivitelerinin bozulmasına, DNA'nın yapısında kırılmalara ve baz değişimlerine neden olduğu belirtilmiştir (Halliwell ve Gutteridge, 2001).

3. GEREÇ VEYÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışma materyali

Bu çalışmanın materyalini Van Büyükşehir Belediyesi mezbahanesine getirilen ortalama 1.5-2 yaşlarında Kıl keçisi ırkı erkek keçilerden alınan kan örnekleri oluşturdu. 91 keçiden alınan kan örneklerinin klinik ve parazitolojik olarak incelenmesi sonucu, anaplasmosis tanısı konulan 35 adet keçi enfekte grup ve anaplasmosis teşhisi konulmayan 10 adet keçi sağlıklı grup olarak kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hastaların değerlendirilmesi

Bu çalışmada incelemeye tabi tutulan hayvanlar öncelikle klinik görünüşleri dikkate alınarak yüksek ateş, iştahsızlık, kilo kaybı, uyuşukluk ve sarılık gibi semptomlar yönüyle incelendi.

3.2.2. Kan örneklerinin alınması

Her bir hayvanın vena jugularisinden hem antikoagülantlı (EDTA) hemde antikoagülantsız tüplere kan alındı. Ayrıca her keçinin kulak ucundan alınan kan örneğinden sürme ince kan frotisi hazırlandı, daha sonra bu frotiler Giemsa yöntemiyle boyandı. Alınan EDTA'lı kanda tam kan sayımı yapıldı. Daha sonra bu kanlar 4000xg +4°C'de 5 dk santrifuj edilerek plazmaları ayrıldı ve geriye kalan eritrosit pelleti eritrosit membranı eldesi için kullanıldı. Elde edilen eritrosit membranında MDA, AOPP, Na⁺/K⁺ATPaz ve protein analizleri yapıldı.

Antikoagülantsız tüplere alınan kanlar 2000 rpm'de 10 dk santrifuj edildikten sonra serumları ayrıldı. Elde edilen bu serumlar anaplasma antikorlarının tespiti için yapılan kompetitif ELISA (c-ELISA) testinde ve biyokimyasal parametrelerin tespitinde kullanıldı.

3.3. Parazitolojik Analiz

Kan frotisinin hazırlanması ve boyanması: Keçilerin kulak ucundan alınan kandan ince yayma kan frotisi yapıldı.

Daha sonra bu frotiler giemsa boyama yapılarak x100 büyütmede ışık mikroskopunda piroplasmik formlar yönünden incelendi.

Competitive- ELISA testi: Çalışma için ticari kompetitif ELISA (c-ELISA) kiti (Anaplasma antibody test kit, c-ELISA, no: 282- 2VMRD-USA) kullanıldı. c-ELISA testi, üretici firmanın test prosedürüne göre yapıldı. c-ELISA yönteminin prensibi antijen antikor reaksiyonuna dayanır.

3.4. Hematolojik Analiz

Hematolojik parametrelerinin ölçümü: EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinde alyuvar (RBC), hemoglobin (Hb), hematokrit (Hct), ortalama alyuvar hacmi (MCV), ortalama alyuvar hemoglobini (MCH), ortalama alyuvar hemoglobin derişimi (MCHC) ve akyuvar (WBC) parametrelerinin tayini, (Melet Schloesing MS4 Vet. Wasson MC-1200. Sysmex K1000) kan sayım cihazında yapıldı.

3.5. Biyokimyasal Analiz

Biyokimyasal serum parametrelerinin ölçümü: Total protein, albümin, globulin, total bilirubin, direkt bilirubin, trigliserit, kolesterol, total demir bağlama kapasitesi (TDBK) ve demir konsantrasyonları ve aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), gama glutamintransferaz (GGT) aktivite tayinleri ticari kit kullanılarak, modüler oto analizör cihazında (Roche, Almanya) yapıldı.

3.6. Eritrosit Membranının Elde Edilmesi

Eritrositlerden membran eldesi modifiye edilmiş Kitao – Hattori metodu'na göre yapıldı (Kitao ve Hattori, 1983).

Ayrıraçlar:

0.1 N HCl: Bir miktar distile su üzerine 8.3 ml HCl ilave edildi ve son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı.

0.08 M Tris: 10.114g Tris tartıldı, bir miktar distile suda çözüldü ve son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı.

5 mM Tris tamponu (pH = 7.4): Bir miktar distile su üzerine 26.56 ml 0.1 N HCl çözeltisi ilave edildi, üzerine 31.25 ml 0.08 M tris çözeltisi eklendi. 9.125g NaCl tartılıp çözeltiliye ilave edildi. Son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı.

10 mM Tris tamponu (pH = 7.4): Bir miktar distile su üzerine 0.1 N HCl çözeltisinden 42.5 ml, 0.08 M tris çözeltisinden 50 ml eklendi. Son hacim distile su ile 800 ml'ye tamamlandı.

Deneyin yapılışı:

ETDA'lı kan örnekleri, 4000xg +4°C'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası plazması atıldı ve geriye kalan eritrosit pelleti aynı miktarda 5 mM tris tamponuyla (pH =7,4) ile üç kez süspanse edildi. Her süspanسیون 3000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilip, süpernatant atıldı. Yıkama işlemi bittikten sonra eritrosit pelleti yaklaşık altı hacim 10 mM Tris tamponuyla (pH =7.4) süspanse edildi. Süspanse numune +4°C'de 15 dk. inkube edildi. İnkübasyon sonrası numune 11.000 rpm'de 70 dk. santrifüj edildi. Bu şekilde eritrositler hemoliz edilmiş oldu. Santrifüj sonrası numune süpernatantı atıldıktan sonra, yine eşit hacimde aynı tampon ile muamele edilerek 11.000 rpm'de 70 dk. tekrar santrifüj edildi. İşleme gri beyaz membran elde edilinceye kadar devam edildi. Elde edilen eritrosit membranı 1:1 oranında 10 mM tris tamponu (pH = 7.4) ile tekrar süspanse edilip -80°C'de saklandı.

3.6.1. Eritrosit membranında MDA analizi

Prensip:

Ohkawa ve ark. (1979), metoduna göre, lipid peroksidasyon ürünü olan, MDA'nın, asit ortamda tiyobarbutirik asit ile ısıtıldığında reaksiyona girerek pembe

renkli bir kromojen oluşturmasına dayanmaktadır. Bu renkli kompleksin 532 nm’de verdiği absorbans ile MDA konsantrasyonu doğru orantılıdır.

Ayrıraçlar:

% 8.1 Sodyum dodesil sülfat (SDS): 8.1 g sodyum dodesil sülfat 100 ml distile suda çözüldü.

%0.8 Tiyobarbitürik asit (TBA) : 0.8 g TBA tartıldı ve 100 ml distile suda çözüldü.

%20 Triklorasetik asit (TCA): 20 g TCA 100 ml distile suda çözüldü.

n-Bütanol/Pridin karışımı: 15/1 oranında hacimce hazırlandı.

Stok standart 1.1.3.3-tetrametoksiopropan çözeltisi: 0.494 ml 1.1.3.3-tetraetoksiopropan 100 ml metil alkolde çözümlenerek, 20 mmol/L’lik stok standart çözelti hazırlandı.

Deneyin yapılışı:

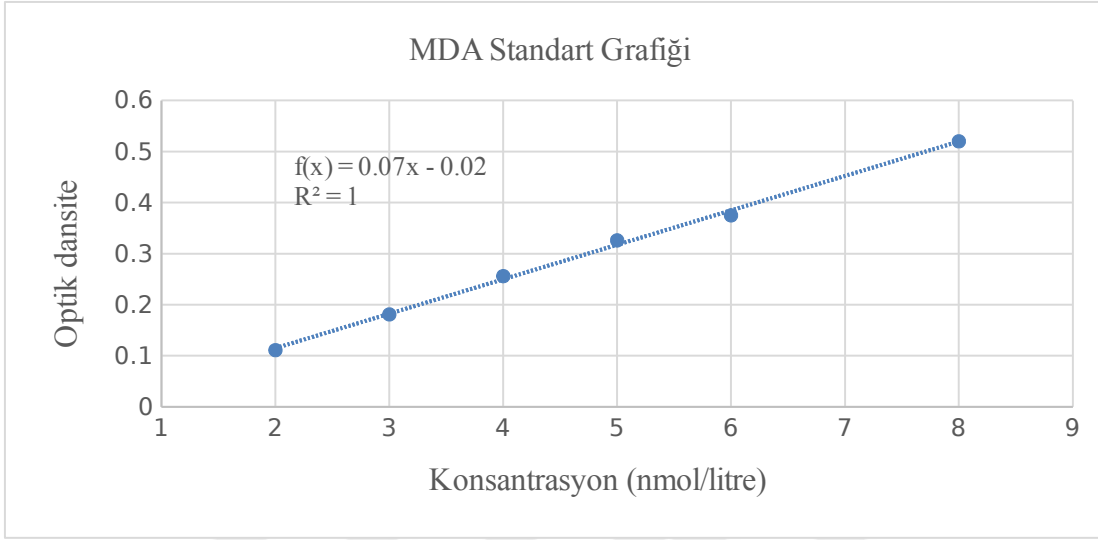
100 µl membran süspansiyonu üzerine, 0.2 ml SDS ilave edilerek karıştırdı. Üzerine 1.5 ml TCA ve 1.5 ml TBA solüsyonu eklenerek 100°C’de su banyosunda 60 dk bekletildi. 60 dk sonunda tüpler soğuduktan sonra üzerlerine 5 ml n-bütanol/piridin eklenip vorteksle karıştırdı. 4000 devirde 10 dk santrifüj edildikten sonra, renkli üst tabakanın absorbansı 532 nm’de okundu. Kör olarak SDS kullanıldı ve numune ile aynı işleme tabi tutuldu.

MDA miktar tayininde kullanılan standart çözeltilerin hazırlanması:

20 mmol/L’lik stok standart çözeltisinden, 6.6 µl alınarak, distile suyla 100 ml’ye tamamlandı. Bu çözeltiden 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 nmol/mL konsantrasyonlarda çalışma standartları hazırlandı. Bu çözeltilerden 100 µl alındı ve numune ile aynı işleme tabi tutuldu.

Sonuçların hesaplanması:

Standart olarak 1.1.3.3-tetraetoksipropan kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisinden MDA konsantrasyonu hesaplandı ve sonuçlar nmol/g protein cinsinden ifade edildi.



Şekil 2. MDA standart grafiği.

3.6.2. Eritrosit membranında AOPP analizi

Prensip:

AOPP ölçümü için Witko-Sarsat ve ark. (1996), kullandığı yöntem bazı değişiklikler yapılarak uygulandı. Yöntemin esası; AOPP' nin asidik ortamda, 340 nm'de maksimum absorpsiyon göstermesini sağlayan potasyum iyodürün varlığında, spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır.

Ayırıcılar:

Glasiyel asetik asit: % 96, v/v olacak şekilde hazırlandı.

20 mmol/L PBS (pH:7.4): Na₂HPO₄'den 5.796 gr, KH₂PO₄'den 0.52 gr ve NaCl'den 8.71 gr tartıldı ve distile su ile 1 litreye tamamlandı.

1.16 mol/L potasyum iyodür (KI): 9.628 g KI tartıldı ve PBS (20 mmol/L, pH:7.4) ile 1 litreye tamamlandı.

Stok standart Kloramin-T çözeltisi: 22.77 mg Kloramin-T tartılarak bir miktar distile suyla çözüldükten sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak, 100 µM'lık stok standart çözelti hazırlandı.

Deneyin yapılışı:

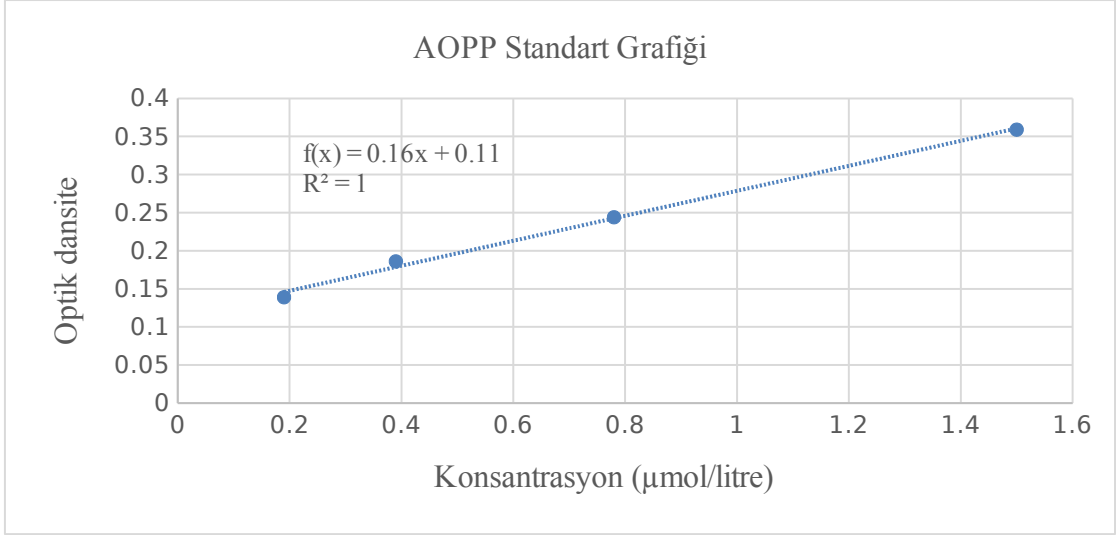
10 mM PBS (pH: 7.4) ile 1:5 oranında seyreltilen membran süspansiyonundan 200 µl alınarak mikropate kuyucuklarına konuldu. Örneklerin üzerine 10 µl 1.16 M KI çözeltisi eklendi. 2 dakika süre ile oda sıcaklığında bekletildi. İkinci dakikanın sonunda üzerlerine 20 µl glasiyel asetik asit konuldu ve 340 nm'de absorbnsları okundu. Kör olarak, 200 µl 10 mM PBS çözeltisi (pH:7.4) kullanıldı ve numune ile aynı işleme tabi tutuldu.

AOPP miktar tayininde kullanılan standart çözeltilerin hazırlanması:

100 µM'lık ana stok kloramin T standart çözeltisinden belirli hacimlerde alınarak distile suyla seyreltilip 80, 60, 40 ve 20 µM konsantrasyonlarda standart çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden 200 µl alındı ve numune ile aynı işleme tabi tutuldu.

Sonuçların hesaplanması:

Standart olarak kloramin T kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisinden AOPP konsantrasyonu hesaplandı ve sonuçlar nmol/g protein cinsinden ifade edildi.



Şekil 3. AOPP standart grafiği.

3.6.3. Eritrosit membranında Na⁺/K⁺ATPaz analizi

Membran süspansiyonunda Na⁺/K⁺ATPaz aktivite ölçümü ticari kit (Goat Na⁺/K⁺ATPase, Catalog No: YLA0092GO) kullanılarak ELISA cihazında, kit prosedürüne göre yapıldı.

Prensip:

Bu kit, keçi Na⁺/K⁺ATPaz aktivitesini test etmek için biotin çift antikorlu sandviç tekniğine dayanan enzime bağlı ELISA (enzyme-linked-immuno-sorbent assay) yöntemi ile çalışır.

Monoklonal Na⁺/K⁺ATPaz antikoruna ile önceden kaplanmış olan kuyucuklara Na⁺/K⁺ATPaz eklenip inkübe edildi. Daha sonra, bağışıklık kompleksi oluşturan streptavidin-HRP ile birleşmek üzere biotin ile etiketlenmiş anti Na⁺/K⁺ATPaz antikorları eklenip, inkübasyon ve yıkamadan sonra bağlanmamış enzimler çıkarıldı. Kromojen A ve B eklendi. Çözelti asidin etkisiyle sarıya döndü. Çözeltinin rengi keçi Na⁺/K⁺ATPaz aktivitesi ile pozitif korelasyon gösterdi.

Deneyin yapılışı:

Numune uygulanması:

1) Blank kuyucuğuna: kromojen A ve kromojen B ve stop solüsyonu eklendi.

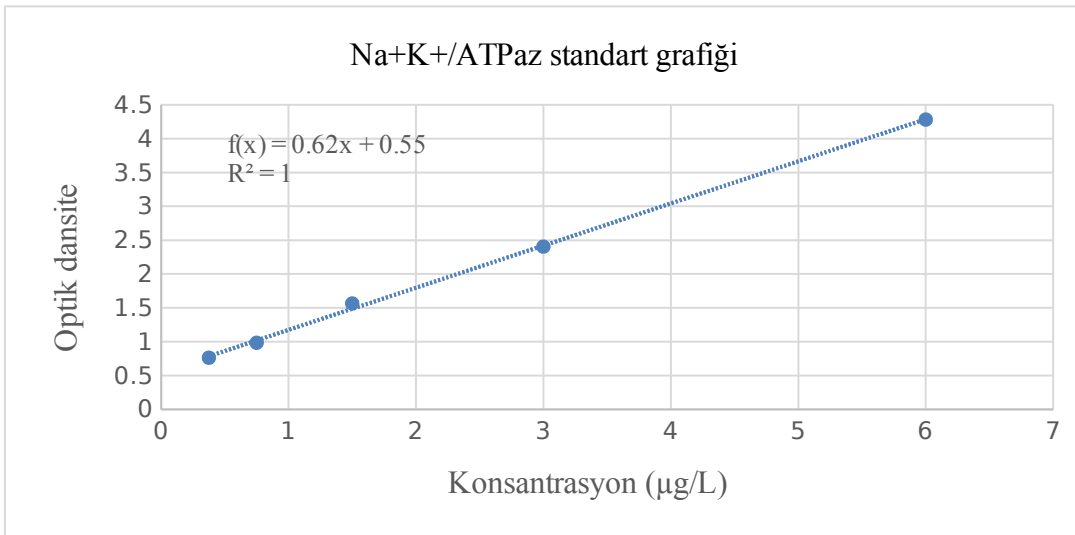
2) Standart kuyucuğuna: 50 µl standart ve 50 µl streptavidin -HRP eklendi.

3) Numune kuyucuğuna: 40 µL eritrosit suspansiyonundan eklendikten sonra her bir kuyucuğa 10 µl Na⁺/K⁺ATPaz antikoru ve 50 µl streptavidin-HRP eklendi. Plak yapıştırıcı band ile kapatıldı. 1 saat 37 °C'de inkübe edildi.

Kuyucukların içeriği boşaltıldı ve 400 µL wash buffer eklenerek her kuyucuk yıkandı. 30 saniye bekledikten sonra sıvı boşaltıldı. Toplamda 6 yıkama olmak üzere 5 kez daha bu işlem tekrarlandı. Son yıkamadan sonra, kağıt havlu ile plak kurulandı. Her kuyucuğa önce 50 µl kromojen A ve sonra 50 µl kromojen B eklenip hafifçe sallandı, renk oluşumu için ışıktan uzakta 10 dakika 37 °C'de inkübe edildi. Her kuyucuğa stop solüsyondan 50 µL eklendi. Oluşan rengin absorbansı 450 nm'de ELISA cihazında (Biotek ELx800) okundu.

Sonuçların hesaplanması:

Absorbansları okunan ve değerleri bilinen standartlar yardımıyla logaritmik olarak çizilen standart eğri grafiğinden Na⁺/K⁺ATPaz aktivitesi hesaplandı, sonuçlar nmol/mg protein cinsinden ifade edildi.



Şekil 4. Na⁺/K⁺ATPaz standart grafiği.

3.6.4. Eritrosit membranı protein tayini

Protein miktar tayini, sığır serum albumininin standart olarak kullanıldığı Lowry yöntemine göre yapıldı (Lowry ve ark., 1951).

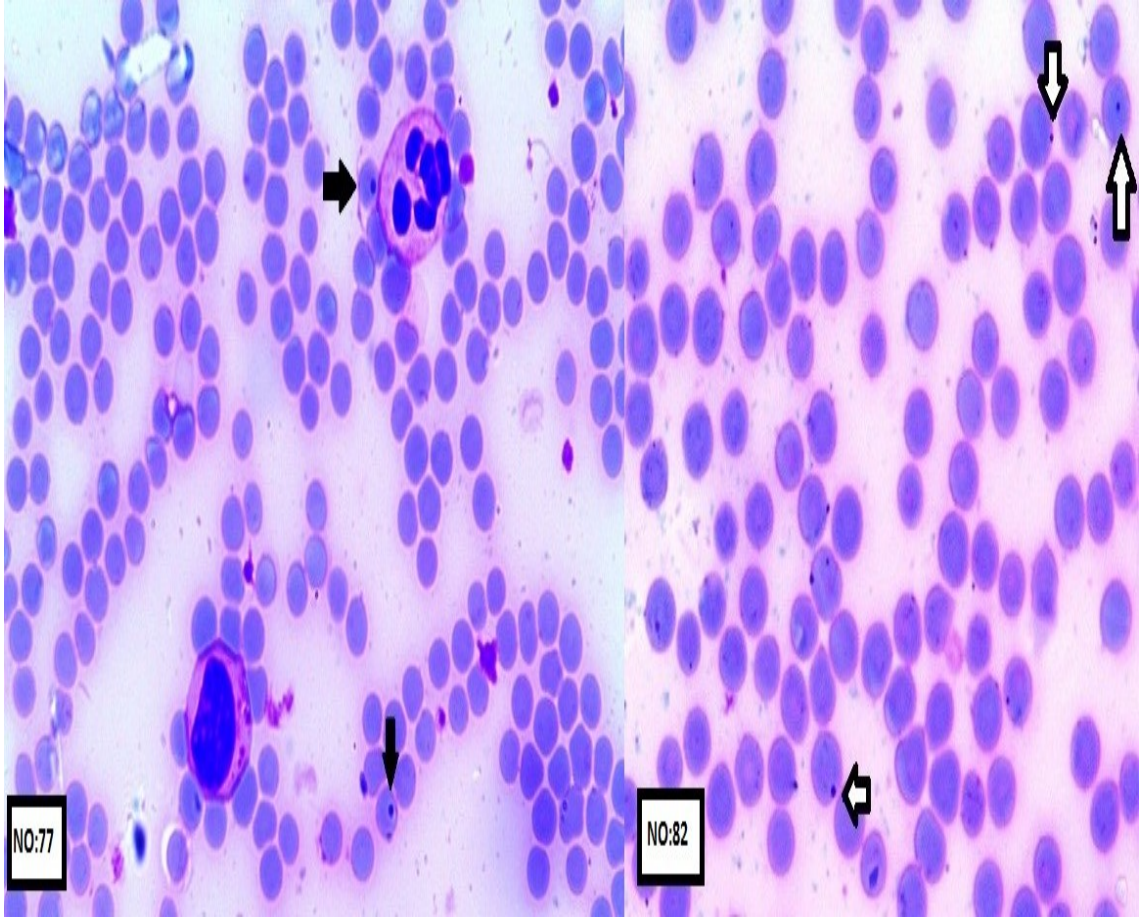
3.7. İstatistik Analiz

İstatistik hesaplamaları SPSS 22 programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel farklar Student t-test kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar $X \pm SE$ olarak verildi. $p < 0.05$ ve altı istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

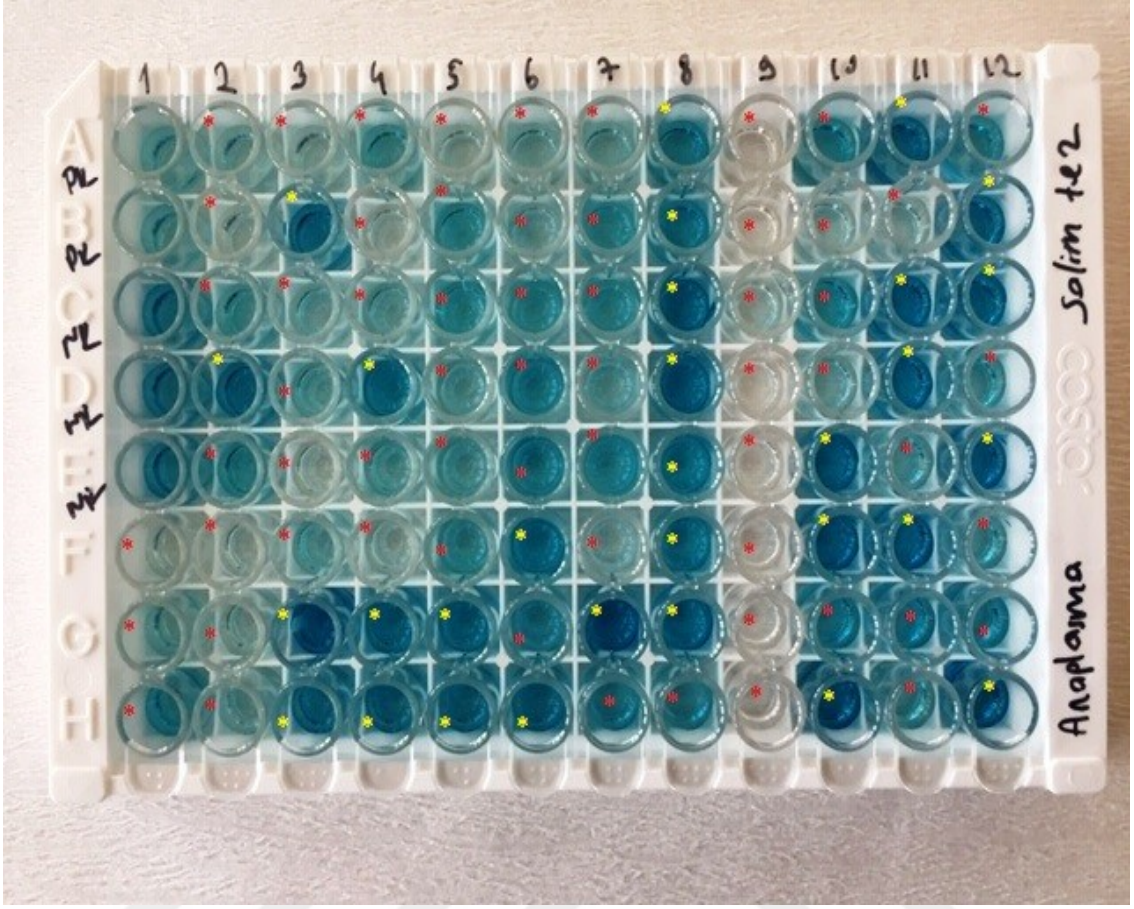


4. BULGULAR

Enfekte keçilerin kulak ucundan alınan kandan yapılan sürme ince kan frotisinin mikroskopik muayenesi ile eritrositler içerisinde mavi-mor renge boyanmış Anaplasma türleri görüldü.



Şekil 5. Kan frotilerinde Anaplasma türlerinin eritrosit içindeki görünümü (beyaz ve siyah oklar). Giemsa Boyama X 100.



Şekil 6. Anaplasma türleri yönünden seropozitif (kırmızı yıldız) ve seronegatif (sarı yıldız) kan serumlarının ELISA pleytindeki görünümü.

Toplanan 91 keçiye ait serum örneği Anaplasma türlerinin antikollarının varlığı yönünde serolojik olarak incelendiğinde % 66'sının (61/91) anaplasmosis yönünden seropozitif olduğu tespit edildi.

Enfekte olan keçilerde toplanan ektoparazitlerinin çoğunluğunun *Dermacentor marginatus* olmak üzere *Melophagus ovinus*, *Hyalomma anatolicum anatolicum* ve *Rhipicephalus bursa* olduğu tespit edildi.

Ektoparaziter muayenede enfestasyon bulunan, kan frotisinde anaplasma etkenleri görünen ve ELISA inhibisyon değeri yüksek çıkan keçilerin kanları hematolojik ve biyokimyasal analizler için kullanıldı.

Tablo 1.Sağlıklı ve anaplasmosisli keçilerde hematolojik parametreler.

Parametreler	Sağlıklı grup (n=10) (X ± SE)	Enfekte grup (n=35) (X ± SE)
WBC (m/mm ³)	8,69±0,41	11,93±0,80*
RBC (m/mm ³)	15,31±0,63	6,41±0,21*
Hb (g/dl)	9,79±0,43	5,56±0,30*
Hct (%)	29,39±1,24	14,24±0,69*
MCV (fl)	20,14±0,79	11,77±0,33*
MCH (pg)	5,96±0,32	4,23±0,18*
MCHC (g/dl)	35,10±1,08	27,82±0,81*

*p<0.05, aynı satırda bulunan parametreler arasındaki önemi gösterir. WBC: Akyuvar, RBC: Alyuvar, Hb: Hemoglobin, Hct: Hematokrit, MCV: Ortalama alyuvar hacmi, MCH: Ortalama alyuvar hemoglobini, MCHC: Ortalama alyuvar hemoglobin derişimi.

Hematolojik parametreler karşılaştırıldığında, sağlıklı gruba göre, enfekte grubun RBC, Hb, Hct, MCV, MCH ve MCHC düzeylerinin azaldığı, WBC düzeyinin ise arttığı belirlendi (p<0.05).

Tablo 2. Sağlıklı ve anaplasmosisli keçilerde biyokimyasal parametreler.

Parametreler	Sağlıklı grup (n=10) (X ± SE)	Enfekte grup (n=35) (X ± SE)
AST (U/L)	100,85±9,57	189,42±18,68*
ALT (U/L)	20,00±1,07	37,00±4,78*
GGT(U/L)	40,71±0,81	96,14±16,02*
T Protein (g/L)	92,14±5,78	69,14±2,52*
Albumin(g/L)	29,57±1,34	24,71±0,75*
Globulin (g/dL)	43,14±2,26	63,42±4,91*
T Bilirubin (mg/dL)	0,66±0,03	0,92±0,03*
D Bilirubin (mg/dL)	0,36±0,01	0,53±0,02*
Trigliserit (mg/dL)	16,43±1,89	31,71±6,74*
T Kolesterol (mg/dL)	91,86±7,69	52,37±1,95*
Demir (µg/dL)	108,28±7,08	141,00±8,95*
TDBK(µg/dL)	254,71±25,51	149,14±16,21*

*p<0.05, aynı satırda bulunan parametreler arasındaki önemi gösterir. ALT: Alanin aminotransferaz, AST: Aspartat aminotransferaz, GGT: Gama glutamil transferaz, TDBK: Total demir bağlama kapasitesi, T: Total, D: Direkt.

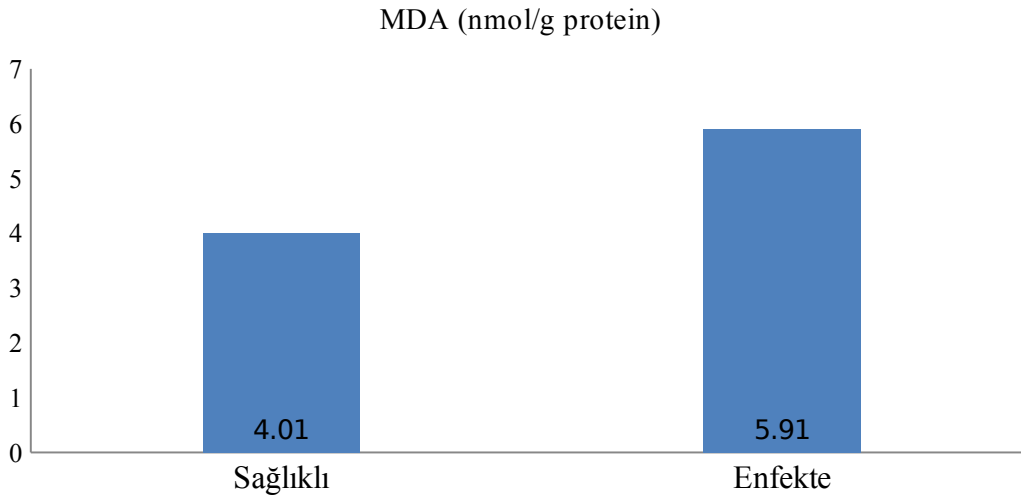
Biyokimyasal parametreler karşılaştırıldığında, sağlıklı gruba göre, enfekte grubun serum AST, ALT, GGT aktivitelerinin ve globulin, T bilirubin, D bilirubin, trigliserit ve demir seviyelerinin arttığı, total protein, albumin, T kolesterol ve TDBK seviyelerinin ise azaldığı belirlendi (p<0.05).

Tablo 3. Sağlıklı ve anaplasmosisli keçilerde eritrosit membranı MDA, AOPP düzeyleri ve Na⁺/K⁺ ATPaz aktivitesi.

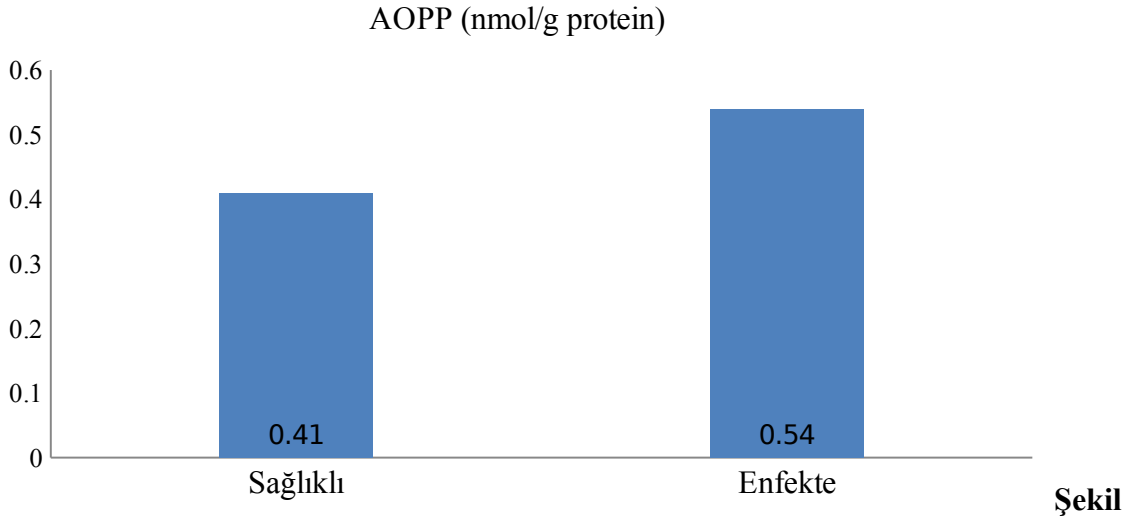
Parametreler	Sağlıklı grup (n=10) (X ± SE)	Enfekte grup (n=35) (X ± SE)
MDA (nmol/g protein)	4,01±0,19	5,91±0,23*
AOPP (nmol/g protein)	0,41±0,01	0,54±0,02*
Na ⁺ /K ⁺ ATP (nmol/mg protein)	3,33±0,18	2,97±0,16*

*p<0.05, aynı satırda bulunan parametreler arasındaki önemi gösterir. MDA: Malondialdehit, AOPP: İleri oksidasyon protein ürünleri. Na⁺/K⁺ ATPaz: Sodyum – potasyum adenozin 5' – trifosfataz.

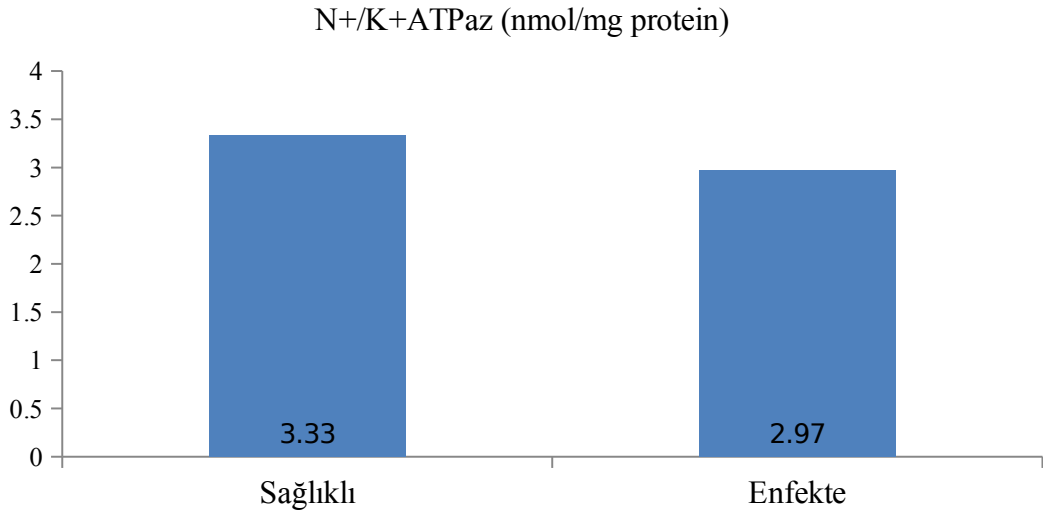
Eritrosit membranında bakılan parametreler karşılaştırıldığında, sağlıklı gruba göre, enfekte grubun eritrosit membranı MDA ve AOPP seviyelerinin arttığı, Na⁺/K⁺ ATPaz enzim aktivitesinin ise azaldığı belirlendi (p<0.05).



Şekil 7. Sağlıklı ve anaplasmosis keçilerde eritrosit membranı MDA düzeyi.



8. Sağlıklı ve anaplasmosisli keçilerde eritrosit membranı AOPP düzeyi.



Şekil 9. Sağlıklı ve anaplasmosisli keçilerde eritrosit membranı N⁺/K⁺ATPaz aktivitesi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Anaplasma etkenleri konakçılarının eritrositlerinin içine ve çevresine yakın yerleşim gösteren, 0.3-1 mikron büyüklükte nokta şeklinde sitoplazmasız organizmalardır. Koyun ve keçilerde anaplasmosise neden olan en önemli türler *Anaplasma ovis* ve *Anaplasma phagocytophilum*'dur (Dumler, 2005). Türkiye’de küçük ruminantlarda anaplasmosisin seroprevalansı ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır. Altay ve ark. (2014), Bingöl, Elazığ, Malatya ve Muş yörelerinde 422 küçük ruminantta anaplasma enfeksiyonunu araştırdıkları çalışmada, kanların % 67.06’sı *A. ovis*, % 19.66’sı *A. phagocytophilum* ve % 15.40’nı her iki tür yönünden pozitif olarak tespit etmişlerdir.

Anaplasma ovis’in esas biyolojik vektörleri *Dermacentor* ve *Rhipicephalus* soyunda bulunan kene türleridir (Rar ve Golovljova, 2011). Bununla birlikte *Anaplasma phagocytophilum* türü Amerika’da, *Ixodes scapularis* ve *I. pacificus* ile Avrupa’da *I. ricinus* ile transstadial olarak taşınmakta ve bulaştırılmaktadır (Ogden ve ark., 2002). Ayrıca Çin’de *Anaplasma ovis*’in halk arasında koyun biti olarak bilinen *Melophagus ovinus* ile mekanik yolla taşındığı ispat edilmiştir (Zhao ve ark., 2018).

Bu çalışmada kullanılan keçilere Anaplasma türlerinin biyolojik veya mekanik naklinin *Dermacentor marginatus*, *Rhipicephalus bursa*, *Hyalomma anatolicum anatolicum* ve *Melophagus ovinus* gibi ektoparazitlerle olabileceği düşünülmektedir (Öter ve ark., 2016).

Koyunlarda anaplasmosis genellikle subklinik seyirli iken, keçilerde patojen bir seyir göstermektedir. Keçilerde akut enfeksiyon esnasında depresyon, halsizlik, zayıflama, ateş, anemi ve süt veriminde azalma görüldüğü bildirilmiştir (Stuen ve Longbottom, 2011). Bu semptomlar keçilerde görülen diğer enfeksiyöz hastalıklarla paralellik gösterebileceği için enfeksiyonun teşhisi, perifer kandan yapılmış preparatların mikroskopik muayenesi ile eritrositler içerisinde mavi-mor renge boyanmış etkenlerin görülmesiyle ve Anaplasma türüne karşı şekillenen spesifik antikörlerin (cELISA yöntemi) veya parazite ait DNA’nın tespit edilmesi ile mümkündür (Kocan ve ark., 2000; Stoltz, 2004).

Sunulan bu çalışmada preparatların mikroskopik muayenesi ile eritrositler içerisinde mavi-mor renge boyanmış Anaplasma türleri görüldü. cELISA testi sonuçlarına göre seropozitiflik oranı % 66 olarak tespit edildi.

Anaplasmosis ile enfekte hayvanlarda eritrositlerinin ozmotik kırılabilirliğinin arttığı tespit ederek, bunun immün aracılı ve oksidatif hasar dahil çeşitli mekanizmalar yoluyla gelişebileceği (Jalali ve ark., 2016), ayrıca yüksek hücre zarı ATPaz aktivitesi ve eritrosit morfolojik değişiklikleriyle ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Nazifi ve ark., 2008).

Anaplasmosiste hastalığın süresi ve şiddetiyle ilişkili olarak konağa ait kan parametrelerinde değişiklikler meydana gelir. Anemi, trombositopeni ve lökopeni gibi hematolojik anormallikler anaplasmosiste sık görülen bozukluklardır (Dumler ve ark., 2001; Woldehiwet, 2010).

Anemide kesin mekanizma net olmasa da, enfekte eritrositlerin hemoliz olmaları, hastalık sırasında artmış lipit peroksidasyonun direkt membran yapısına zarar vermesine ve antioksidan savunmadaki zayıflığa bağlanmaktadır (Nazifi ve ark., 2008; Khaki ve ark., 2018).

Anaplasmosis ile enfekte olan koyun ve keçi kanlarının hemogram sonuçlarının değerlendirildiği farklı çalışmalarda, kontrollere göre RBC, Hb ve Hct değerlerinin anlamlı şekilde düştüğü tespit edilmiştir (Ahmadi-hamedani ve ark., 2012; Yasini ve ark., 2012; Saeed ve ark., 2016; Naqid, 2017; Khaki ve ark., 2018). Bununla birlikte bazı çalışmalarda *A. ovis* ile enfekte keçilerde bu parametrelerin değişmediği bildirilmiştir (Jalali ve ark., 2016; Igwenagu ve ark., 2018). Sunulan çalışmada, yukarıdaki literatür sonuçlarına paralellik gösterecek şekilde, anaplasmosisli keçi kanlarının hematolojik analizi, RBC, Hct ve Hb değerlerinde önemli düşüş olduğunu gösterdi. Bu parametrelerin düşmesi, Anaplasma etkenin salgıladığı pirojenler nedeniyle zarar gören eritrositlerin ekstravasküler hemoliz olduğunu ve bu eritrositlerin retiküloendotelial sistem tarafından fagositozundan kaynaklanmış olan aneminin varlığını ortaya koyar (Ahmadi-hamedani ve ark., 2012; Saeed ve ark., 2016).

Aneminin morfolojik sınıflandırması MCH, MCHC ve MCV'ye göre yapılır (Dumler ve ark., 2005). Genel olarak anaplasma enfeksiyonu, hemoglobin ve rejeneratif yapıda olan ve eritrosit endekslerinde bir azalmaya neden olur. Daha önce yapılan çalışmalarda *A. ovis*'ten etkilenen küçük ruminantlarda makrositik hipokromik (Ahmadi-Hamedani ve ark., 2012; Khaki ve ark., 2015), normokromik normositik (Jalali ve ark., 2016) ve makrositik normokromik (Yasini ve ark., 2012) aneminin geliştiği vurgulanmıştır. Sunulan çalışmada enfekte keçilerde hemotokrit parametrelerin etkilenmesi ile birlikte anlamlı derecede MCH, MCHC ve MCV değerlerinin azaldığı tespit edildi. Bu durum enfekte hayvanlarda mikrositik hipokromik aneminin geliştiğine işaret edebilir.

Bu çalışmada enfekte hayvanlarda WBC sayısındaki anlamlı artış Saeed ve ark. (2016), bulguları ile tutarlıdır. Bu artış anaplasma varlığına bağlı olarak lenfoid organların aktivasyonuna ve kronik antijenik stimülasyona bağlanabilir (Latimer ve ark., 2003). Bununla birlikte diğer araştırmacılar WBC sayısında önemli olmayan artış (Jalali ve ark., 2016; Igwenagu ve ark., 2018) ve azalış (Ahmadi-hamedani ve ark., 2012) olduğunu tespit etmişlerdir.

Üre, kreatinin, kolesterol, trigliserit, albümin, globülin, total protein, total lipit, bilirubin gibi kan parametreleri, ayrıca amilaz, AST, ALT, ALP, CK gibi önemli enzimler biyokimyasal profili belirleyen önemli parametrelerdir. Bu parametrelere dayanarak hastalığın patogenezi ve prognozu ile ilgili önemli bilgiler elde edilir (Karagül ve ark., 2000; Mehmetoğlu, 2002). Paraziterler, üzerinde yaşadıkları konakçının biyokimyasal profilinde oldukça önemli değişikliklere neden olur (Ahmadi-hamedani ve ark., 2012). Bu çalışmanın sonuçları, anaplasmosisin keçilerde seçilen biyokimyasal parametrelerde değişikliklere yol açtığını göstermiştir.

ALT ve AST vücutta birçok organ ve dokuda yaygın olarak bulunan hücre içi enzimlerdir. ALT karaciğer ve böbreklerde fazla, kalp ve iskelet kasında daha az miktarda bulunur. AST daha çok kalp kası, karaciğer ve iskelet kaslarında bulunur. GGT, böbrek, karaciğer, dalak, safra kesesi ve pankreasta bulunan bir enzimdir. Bu dokulardan herhangi birinde oluşan hasarda bu enzimlerin kandaki aktiviteleri değişir (Liang ve ark., 2018).

Yapılan çalışmalarda *Anaplasma ovis* ile enfekte olan hayvanlarda AST, GGT (Ahmadi-Hamedani ve ark., 2014), ALT ve ALP (Hornok ve ark., 2007) aktivitelerinde artış olduğu tespit edilmiştir. Yukardaki verilerden farklı olarak, anaplasmosiste AST aktivitesinin azaldığı (Khaki ve ark., 2018), ALT aktivitesinin değişmediği (Kumar ve ark., 2010) belirlenmiştir. Bu çalışmada, anaplasmosis ile enfekte olan keçilerde, karaciğer için spesifik olan ALT, AST ve GGT enzim aktivitelerinde anlamlı ($p<0.05$) bir artış olduğu belirlendi. Anaplasmosiste anemiye bağlı olarak gelişen hipoksi, karaciğerde hasar meydana getirerek bu enzimlerde aktivite artışına neden olmuş olabilir (Liang ve ark., 2018).

Eritrositlerin parçalanması sonucu ortaya çıkan bilirubinin ölçümü, karaciğer, hemolitik, hematolojik ve metabolik bozuklukların tanı ve tedavisinde kullanılır (Karagül ve ark., 2000). Sunulan çalışmada enfekte keçilerde serum total ve direkt bilirubin konsantrasyonlarında belirgin bir artış olduğu tespit edildi. Bu sonuç önceden bildirilen çalışmaların sonuçları ile uyumludur (Ahmadi-Hamedani ve ark., 2014; Khaki ve ark., 2018). Bilirubin seviyelerindeki bu anlamlı artıştan, parazitli eritrositlerin hemolizi ve hepatik fonksiyon bozukluğu sorumlu olabilir (Khaki ve ark., 2018). Yukarıdaki çalışmaların sonuçlardan farklı olarak total bilirubin seviyesinin anlam göstermeyecek şekilde azaldığı (Kumar ve ark., 2010) veya fizyolojik sınırlarda olduğu (Hornok ve ark., 2007) bildirilmiştir.

Karaciğer tarafından sentez edilen albumin ve globulin iki ana serum proteindir. Bu proteinlerinin konsantrasyonu, dağılımı ya da sentez hızları, yıkımı veya atılması pek çok hastalıklardan etkilenir. Total protein değeri, fraksiyonel dağılımı ve A/G oranındaki değişiklikler genellikle protein metabolizmasındaki bozuklukları değerlendirmek için kullanılır (Karagül ve ark., 2000; Mehmetoğlu, 2002).

Yapılan çalışmalarda kontrollere göre anaplasmosisli hayvanlarda serum total protein ve globulin seviyelerinde önemli artışın olduğu bildirilmiştir (Kumar ve ark., 2010; Khaki ve ark., 2018). Yapılan diğer araştırmalarda ise, enfekte olan hayvanlarda total protein (Hornok ve ark., 2007; Ahmadi-Hamedani ve ark., 2014) ve albumin (Ahmadi-Hamedani ve ark., 2014; Khaki ve ark., 2018) seviyelerindeki artışın anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Kumar ve ark. (2010), ise enfekte hayvanların serum albumin seviyelerinin önem göstermeyecek şekilde azaldığını bulmuşlardır. Bu çalışmada,

enfekte keçilerde kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı olacak şekilde serum total protein ve albümin seviyelerinde azalma, bununla birlikte globulin seviyesinde artış olduğu belirlendi. Azalmış albümin seviyesi, akut faz proteini olması, açlık ve karaciğer bozukluğu nedeniyle olabilir. Serum globulin seviyesindeki artış ise antijenik stimulasyona yanıt olarak γ -globulinin artması ile ilişkilendirilebilir.

Plazma lipitleri, enerji deposu olarak rol oynarlar ve hücrenin önemli yapısal bileşenidirler. Kolesterol, kolesterol esterleri, trigliseritler ve fosfolipidler başlıca plazma lipitleridir. Kolesterol steroid bir alkoldür, bazı lipoproteinlere katılarak plazmada perifer dokulara taşınır. Trigliseritler yağ asitlerinin gliserol esteridirler. Trigliserit ve kolesterolün sentezlendiği başlıca organ karaciğerdir (Karagül ve ark., 2000). Ruminantlarda kan lipit profili, rasyon, yaş, cinsiyet, gebelik, genetik, mevsim, laktasyon, karaciğer ve safra kesesinin hastalıklarında değişir (Sengül ve ark., 2017).

Anaplasma enfeksiyonunda serum kolesterol ve trigliserit düzeyleri farklı sonuçlar ortaya koymaktadır. Ahmadi-Hamedani ve ark. (2014), sağlıklı ve *A. ovis* ile enfekte keçiler arasında kolesterol ve trigliserit seviyesi açısından önemli bir fark olmadığını, Khaki ve ark. (2018), ise kolesterol seviyesinde önemli bir azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada anaplasma ile enfekte hayvanlarda anlamlı olacak şekilde trigliserit seviyesinin yükseldiği, kolesterol seviyesinin düştüğü tespit edildi. Trigliserit düzeyinin yüksek olması, karaciğerde yapımını stimüle eden yağ doku lipolizisine bağlı olabilir. Total kolesterol düzeyinin düşük bulunması ise, karaciğer hasarına bağlı normal sentezinin aksamasından kaynaklanmış olabilir.

Demir pek çok canlı için esansiyel bir elementtir ve yaşamsal öneme sahiptir. Oksijen taşınması, enerji yapımı, DNA, RNA ve protein sentezinde görev alır. Organizmada bulunan demirin % 60-70'i eritrosit içerisinde hemoglobinde, % 10'u miyoglobin ve sitokromlarda ve demir içeren enzimlerde. Kalan % 20-30'u kullanılmak üzere karaciğer başta olmak üzere depolanır (Hoffbrand ve ark., 2006). TDBK kandaki transferrin konsantrasyonunun bir ölçüsüdür. TDBK inflamatuvar hastalıklarda azalır veya normal sınırlarda kalır (Weiss ve Wardrop., 2010).

Khaki ve ark. (2018), anaplasmosisli koyunlarda anemi ile birlikte serum demir seviyesinin belirgin şekilde arttığını, TDBK istatistiki olarak anlam göstermeyecek

şekilde azaldığını tespit etmişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada *A. ovis*'ten etkilenen keçilerde önemli olmayan artışlar olduğu kaydedilmiştir. Bu artış eritrosit kırılabilirliğinin artması ve sonraki RBC'lerin intravasküler hemolizi ile ilişkilendirilmiştir (Jalali ve ark., 2016). Çalışmamızda istatistiki olarak önem gösterecek şekilde anaplasmosisli keçilerde serum demir seviyesinin arttığı, TDBK seviyesinin ise azaldığı belirlendi. RBC'lerin intravasküler hemolizi sonucu arttığı düşünülen demir iyonları, serbest radikal oluşturan güçlü bir oksidatif katalist olarak oksidatif hasarı şiddetlendirmiş olabilir (Cavdar ve ark., 2003). TDBK düzeyinin azalması hastalık sonucu gelişen inflamasyona bağlı olarak negatif akut faz reaktan olan transferinin azalması ile ilişkili olabilir (Weis ve Wardrop, 2010).

Farklı parazit türleri ile enfekte olmuş konakçı hücrelerinde, reaktif oksijen türlerinin miktarı (ROS) artar ve böylece hücre ve doku hasarı meydana gelir. ROS biyolojik sistemlerdeki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu indükler ve lipid peroksidasyon ürünlerinin oluşumuna yol açar. Membranlarda lipid peroksidasyonu sonucu membran permeabilitesi artar. Lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehidler üreterek, diğer hücre bileşenlerine zarar verir. MDA, bir lipid peroksidasyon ürünüdür. MDA seviyelerinin ölçümü, lipid peroksidasyon derecesini ve serbest radikal seviyelerini ölçmek için kullanılır. Eritrosit membranı çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengin ve sürekli yüksek oksijen konsantrasyonuna maruz kaldığı için lipid peroksidasyonuna çok duyarlıdır (Esmailnejad ve ark., 2012).

Anaplasmosis etkenleri konakçı eritrositlerine yerleşerek çoğalır ve eritrositlerin parçalanmasına neden olurlar. MDA düzeyinin *Anaplasma marginale* ile enfekte sığırlarda (Ergönül ve Konaş Aşkar, 2009; El-Ashker ve ark., 2015) arttığı, bununla birlikte *Anaplasma ovis* ile enfekte koyunlarda değişmediği (Jalali ve ark., 2016) tespit edilmiştir. Anaplasmosisli keçilerde eritrosit membranı MDA düzeyi hakkında herhangi bir veriye rastlanmamıştır. Bu çalışmada anaplasma enfeksiyonunun keçilerde eritrosit membranı MDA düzeyini arttırdığı tespit edildi. Bu sonuç enfeksiyon süresince ortaya çıkan reaktif oksijen türlerinin miktarının artışına bağlı olarak indüklenmiş lipid peroksidasyonuna bağlı olabilir.

Proteinlerin, O⁻, OH⁻ ve H₂O₂ gibi reaktif oksijen türleri ile direkt olarak veya oksidatif stresin sekonder ürünleri ile indirekt olarak kovalent modifikasyonuna protein oksidasyonu denir. Proteinler oksidanlara maruz kaldıklarında birçok kovalent değişikliğe uğrar. Bu değişikliklerden bazıları serbest radikallerin protein molekülleri üzerine direkt etkileri sonucu oluşabildiği gibi, bazıları da oksidasyon yan ürünlerinin proteinlere kovalent olarak bağlanması ile meydana gelir. Proteinlerin oksidasyonu, bir dizi bozukluğun ve hastalığın etiyolojisi veya ilerlemesinde rol oynar. Protein oksidasyonu ürünleri arasında yer alan AOPP, çapraz bağlanma ürünleri olarak tanımlanmaktadır. AOPP tayini, protein oksidasyonunun derecesini belirlemede kullanılır (Kayalı ve ark., 2003).

AOPP ölçümü çeşitli hastalıklarda inflamatuvar belirteç olarak kullanılmaktadır. Serum AOPP düzeyinin kan parazitlerin neden olduğu malarya (Nhabomba ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2014) ve babesiosiste (Baldissera ve ark., 2016) arttığı belirlenmiştir. Ayrıca köpeklerde intra eritrositik parazit olan *Rengalia vitalie* enfeksiyonunda lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve antioksidan enzimlerin birlikte değerlendirildiği bir çalışmada lipid peroksidasyonu ürünü olan TBARS'ın ve AOPP seviyesinin paraziteminin derecesine göre arttığı belirtilmiştir (França ve ark., 2012). Yapılan literatür taramalarında anaplasmosisli keçilerde eritrosit membranı AOPP düzeyleri hakkında herhangi bir veriye rastlanmamıştır. Bu çalışmada anaplasma enfeksiyonunun eritrosit membranı AOPP düzeyini arttırdığı tespit edildi. Bu sonuç enfeksiyon süresince ortaya çıkan reaktif oksijen türlerinin miktarının artışına bağlı olarak proteinlerin yapı ve fonksiyonlarında değişikliklere neden olduğunu göstermektedir.

Na⁺/K⁺ATPaz, membran bütünlüğünün ve hücredeki iyon dengesinin korunmasında sorumlu olan membrana bağlı transpot enzimidir. Na⁺/K⁺ATPaz direkt veya indirekt olarak birçok temel hücresel işlevleri kontrol eder ve bu enziminin regülasyonu çeşitli patolojik süreçlerin etiyolojisinde etkilidir (Akbulut, 2008). Ayrıca hücrelere zarar veren serbest oksijen radikallerinin oluşumundan etkilenen enzimler arasında ilk sırada yer almaktadır (Nikolic ve ark., 2004).

Daha önce Anaplasma türleri ile ilgili $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ aktivitesinin değerlendirildiği bir araştırmaya rastlanılmamasına rağmen, intraeritrositik kan paraziti olan Malaria ve Babesia türleri ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Malaria ile yapılan ilk çalışmalarda, eritrositlerde Na^+ iyonunun artarken, K^+ iyonunun azaldığı, bunda eritrosit $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ aktivitesinin inhibisyonundan kaynaklandığı belirtilmiştir (Nikolic ve ark., 2004). Na^+/K^+ pompasının inhibisyonunun altında yatan mekanizmalar belirsiz olmasına rağmen, Kirk ve ark. (2001), sıtma enfeksiyonundan sonra, eritrositin fiziksel/kimyasal özelliklerinde birçok değişiklik meydana geldiğini ve bunların herhangi birinin endojen transport sistemlerinin aktivitesini değiştirmesinin mümkün olabileceğini bildirmişlerdir. Buna ek olarak, parazitler tarafından indüklenen yeni alım yollarının (NPP'ler) endojen taşıyıcıların aktivitesini etkileyebileceği iddia edilmiştir. Parazitlerin eritrositlerde hayatta kalmak için, konakçı plazma zarının geçirgenliğini ya mevcut taşıyıcıların artışını sağlayarak ya da NPP'ler oluşturarak değiştirdiği rapor edilmiştir (Alessandra ve Caracappa, 2012). Staines ve ark. (2001), *Plasmodium falciparum* ile enfekte olmuş insan eritrositlerinde $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ aktivitesinin, NPP'ler yoluyla iyonların sızmasını engellemek için istiladan 24-36 saat sonra arttığını, daha sonra kademeli olarak azaldığını tespit etmişlerdir. Yapılan diğer bir malaria çalışmasında ise $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ aktivitesinde önemli değişiklik olmadığı bulunmuştur (Pabo'n ve ark., 2003).

Yur ve ark. (2010), babesiosis ile doğal enfekte koyunlarda, eritrosit $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ aktivitesinin sağlıklı koyunlardan düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Bunun nedeninin Na^+/K^+ pompası yerine iyonların akışı için NPP'lerin kullanılmasından kaynaklanmış olabileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada Anaplasmosis'li keçilerde eritrosit membranı $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ aktivitesinin azaldığı tespit edildi. $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ aktivite kaybı hücre içi iyonik dengenin bozulmasına yol açarak eritrositlerin hemolizini hızlandırmış olabilir.

Elde edilen sonuçlar, hematolojik ve biyokimyasal parametrelerde önemli değişiklikler olduğunu, aneminin ve oksidatif stresin ruminantlarda anaplasmosisin ortak bir komplikasyonu olduğunu, ayrıca MDA, AOPP düzeylerinin ve $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ aktivitesinin belirlenmesinin hastalığın prognozunun takip edilmesinde faydalı olabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Ahmadi-hamedani M, Ahmadi-hamedani M, Fathi E, Narenji Sani RN. Comparison of selected biochemical parameters between naturally infected and non-infected goats with *Anaplasma ovis*. *Comp Clin Pathol*. 2014; 23: 989-92.
- Ahmadi-hamedani M, Khaki Z, Rahbari S, Ahmadi-hamedani MA. Hematological profiles of goats naturally infected with *Anaplasma ovis* in North and Northeast Iran. *Comp Clin Pathol*. 2012; 21: 1179-82.
- Akbulut S. Diabetik Polinöropatili Hastalarda Eritropoietin Uygulamasının Eritrosit Na⁺/K⁺ATPaz Enzim (E.C.3.1.6.37) Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması. [Uzmanlık Tezi]. Konya: Selçuk Üniversitesi; 2008.
- Alessandra T, Caracappa S. Tick-borne diseases in sheep and goats: Clinical and diagnostic aspects. *Small Rum Res*. 2012; 1065: 6-11.
- Altay K, Dumanlı N, Aktas M, Ozubek S. Survey of anaplasma infections in small ruminants from East part of Turkey. *Kafkas Uni Vet Fak Derg*. 2014; 20: 1-4.
- Altıntaş S. Kahramanmaraş'ta Bazı İş Kollarında Çalışan Boya İşçilerinde; Plazma ve Eritrosit Membranı Sialik Asit, Glutasyon, Plazma Nitrik Oksit ve Lipid Peroksidasyonu Düzeylerinin Değerlendirilmesi. [Yüksek Lisans Tezi]. Kahramanmaraş: Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi; 2006.
- Aygün P. Etanollü Türk Propolis Ekstraktının T-BHP ile Uyarılmış Oksidatif Hasara Karşı Koruyucu Etkisinin İncelenmesi. [Yüksek Lisans Tezi]. Trabzon. Karadeniz Teknik Üniversitesi; 2018.
- [Baldissera MD](#), [Sagrillo MR](#), [de Sá MF](#), [Grando TH](#), [Souza CF](#), [de Brum GF](#), et al. Relation ship between DNA damage in liver, heart, spleen and total blood cells and disease pathogenesis of infected rats by *Trypanosoma evansi*. [Exp Parasitol](#). 2016; 161:12-9.
- Cavdar C, Temiz A, Yeniçerioglu Y, Çalışkan S, Çelik A, Sifil A, et al. The effects of intravenous iron treatment on oxidant stress and erythrocyte deformability in hemodialysis patients. [Scand J Urol Nephrol](#). 2003; 37:77–82.
- Cicha I, Suzuki Y, Tateishi N, Maeda N. Enhancement of red blood cell aggregation by plasma triglycerides. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2001; 24: 247-55.
- Dumanlı N, Altay K, Aydın MF. Türkiye'de sığır, koyun ve keçilerde belirlenen kene türleri. *Türkiye Klinikleri Vet Bil Derg*. 2012; 3(2): 67-72.
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001; 51: 2145-65.
- Dumler JS. Anaplasma and Ehrlichia infection. *Ann NY Acad Sci*. 2005; 1063: 361-73.
- Ekici S. Konya ve Karaman Yöresinde Koyun ve Keçilerde Anaplazmozisin Yaygınlığı. [Doktora Tezi]. Konya: Selçuk Üniversitesi; 2016.

[El-Ashker M, Hotzel H, Gwida M, El-Beskawy M, Silaghi C, Tomaso H](#). Molecular biological identification of Babesia, Theileria, and Anaplasma species in cattle in Egypt using PCR assays, gene sequence analysis and a novel DNA microarray. [Vet Parasitol.](#) 2015; 30(3-4):329-34.

Eren H, Karagenç T. Rickettsiales. In: Veteriner Protozooloji. Eds: Dumanlı N, Karaer Z. Ankara, Medisan Yayınevi: 2010; 229-38.

Ergönül S, Konaş Aşkar T. Anaplasmosis'li sığırlarda ısı şok protein (HSP), malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO) ve interlökin (IL-6, IL-10) düzeylerinin araştırılması. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2009; 15 (4): 575-79.

Esmailnejad B, Tavassoli M, Asri-Rezaei S, Dalir Naghadeh B. Evaluation of antioxidant status and oxidative stress in sheep naturally infected with *Babesia ovis*. [Vet Parasitol.](#) 2012; 185: 124-30.

[França RT, Da Silva AS, Costa MM, Paim FC, Paim CB, Thomé GR](#), et al. Relationship between oxidative stress and clinical-pathological aspects in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. [Res Vet Sci.](#) 2012; 93(3):1309-13.

Fuller W, Tulloch LB, Shattock MJ, Calaghan SC, Howie J, Wypijewski KJ. Regulation of the cardiac sodium pump. [Cell Mol Life Sci.](#) 2012; 70(8):1357-80.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Third Edition, Oxford science publications. 2001; 22-4.

Hoffbrand AV, Moss PAH, Pettit JE. Eritropoiesis and general aspects of anemia. In: Hoffbrand AV, Moss PAH, Pettit JE, editors. Essential Hematology. Oxford: Blackwell publishing. 2006; 12-28.

Hornok S, Elek V, de la Fuente J, Naranjo V, Farkas R, Majoros G, et al. First serological and molecular evidence on the endemicity of *Anaplasma ovis* and *A. marginale* in Hungary. [Vet Microbiol.](#) 2007; 122(3-4): 316-22.

Igwenagu E, Onyiche ET, Abdullahi UF, Maina MM, Jatau SH, Monguno MB, et al. Prevalence of *Anaplasma ovis* and its effects on haematology of apparently healthy Sahel goats in Maiduguri, Nigeria: A Preliminary study. [S V J.](#) 2018; 1(1): 1-5.

Jalali SM, Bahrami S, Rasooli A, Hasanvand S. Evaluation of oxidant/antioxidant status, trace mineral levels, and erythrocyte osmotic fragility in goats naturally infected with *Anaplasma ovis*. [Trop Anim Health Prod.](#) 2016; 48:1175-81.

Karabulut H, Gülay M.S. Serbest radikaller. [MAKÜ Sağ Bil Enst Derg.](#) 2016; 4: 50-9.

Karagül H, Altıntaş A, Fıdancı UR, Sel T. Klinik biyokimya. Ankara: Medisan Yayınevi; 2000: 161-4.

Kayalı R, Telci A, Çakatay U, Karaca Ç, Akçay T, Sivas A, et al. Oxidative protein damage parameters in plasma in chronic experimental diabetes in rats: [Eur J Med Res.](#) 2003; 8: 307-12.

Khaki Z, Yasini SP, Jalali SM, Kazemi B, Jalali MHR. A study of hematological changes in sheep naturally infected with *Anaplasma* spp. and *Theileria ovis*: molecular diagnosis. [Iran J Vet Med.](#) 2015; 9, 19-26.

- Khaki Z, Yasini SP, Jalali SM. A survey of biochemical and acute phase proteins changes in sheep experimentally infected with *Anaplasma ovis*. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2018; 8:565-70.
- Kirk K, Staines HM, Ellory JC. Perturbation of the pump-leak balance for Na⁺ and K⁺ in malaria-infected erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001; 280: 1576–87.
- Kitao T, Hattori K. Inhibition of erythrocyte ATPase activity by a clacynomycin and reverse effect of ascorbate on ATPase activity. *Experientia.* 1983; 39: 1362-64.
- Kocan KM, Blouin EF, Barbet AF. Anaplasmosis control past, present and future. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 916: 501–9.
- Krachler B, Norberg M, Eriksson JW, Hallmans G, Johansson I, Vessby B, et al. Fatty acid profile of the erythrocyte membrane preceding development of Type 2 diabetes mellitus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2008; 18(7): 503-10.
- Kumar A, Vihan VS, Sharma HN. Haematological and biochemical effects of tick infestation in common Indian Goat. *Adv Biores.* 2010; 1(1): 164 -169.
- Latimer KS, Mahaffey EA, Prasse KW. *Veterinary laboratory medicine, clinical pathology.* (4th ed.). USA: Iowa; 2003.
- [Liang S](#), [Ma HY](#), [Zhong Z](#), [Dhar D](#), [Liu X](#), Xu J, et al. NADPH oxidase in liver macrophages promotes inflammation and tumor development in mice. *Gastroenterology.* 2019; 156(4):1156-72.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Far AL, Randall RJ. Protein measurement with folinphenol reagent, *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-75.
- Mehmetoğlu İ. *Klinik biyokimya laboratuvarı el kitabı.* Konya. İnci Ofset; 2002.
- Naqid IA. Prevalence of *Anaplasma ovis* infection in Angora goats of Duhok province, Kurdistan region-Iraq. *Iraqi J Vet Sci.* 2017; 31 (2):73-9.
- Nazifi S, Razavi SM, Mansourian M, Nikahval B, Moghaddam M. Studies on correlation among parasitemia and some hemolytic indices in two tropical diseases (theileriosis and anaplasmosis) in Fars province of Iran. *Trop Anim Health Prod.* 2008; 40:47–53.
- Nhabomba AJ, Guinovart C, Jiménez A, Manaca MN, Quintó L, Cisteró P, et al. Impact of age of first exposure to *Plasmodium falciparum* on antibody responses to malaria in children: a randomized, controlled trial in Mozambique. *Malar J.* 2014; 27:13:12.
- Nikolic M, Stanic D, Antonijevic N, Niketic V. Cholesterol bound to hemoglobin in normal human erythrocytes: a new form of cholesterol in circulation. *Clin Biochem.* 2004; 37:22-6.
- Ogden NH, Casey ANJ, French NP, Woldehiwet Z. Review of studies on the transmission of *Anaplasma phagocytophilum* from sheep: implications for the force of infection in endemic cycles. *Exp Appl Acaro.* 2002; 28(1-4): 195-202.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95: 351–8.

- Okur G. Fındık Tüketiminin Hiperkolesterolemili Şahısların Eritrosit Membranı Lipid ve Protein Oksidasyonuna Etkisi.[Yüksek lisans tezi]. Trabzon. Karadeniz Teknik Üniversitesi; 2008.
- Öter K, Cetinkaya H, Vuruşaner C, Toparlak M, Ergünay K. Molecular detection and typing of anaplasma species in small ruminants in Thrace Region of Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2016; 22 (1): 133-8.
- Pabo'n A, Carmona J, Burgos LC, Blair S. Oxidative stress in patients with non-complicated malaria. *J Clin Biochem.* 2003; 36(5): 71–8.
- Patrick G, Gallagher MD. Update on the clinical spectrum and genetics of red blood cell membrane disorders. *Curr Hematol Rep.* 2004; 3: 85-91.
- Rar V, Golovljova I. *Anaplasma*, *Ehrlichia* and *Candidatus Neoehrlichia* bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. *Infect Genet Evol.* 2011; 11:1842–61.
- Rymaszewska A, Grenda S. Bacteria the genus *Anaplasma*-Characteristics of *Anaplasma* and their vectors. *Veterinarni Medicana.* 2008; 53 (11): 573-84.
- Saeed K, Niaz AKS, Akhtar N. Serodiagnosis and haematological effect of anaplasmosis in goats and sheep of district Mardan, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *W JZ.* 2016; 11 (2): 67-80.
- Sengul Y, Mert H, Mert N. Determination of serum lipid profile and lipoprotein levels of sheep with naturally acute babesiosis. *Van Vet J.* 2017; 28 (1): 1-4.
- Shin S, Ku Y, Park MS, Suh J. Measurement of red cell deformability and whole blood viscosity using laser-diffraction slit rheometer. *Rheology.* 2004; 16: 85-90 .
- Sikorski AF, Lorenz BH, Jezierski A, Dluzewski AR. Interaction of membrane skeletal proteins with membrane lipid domain. *Acta Biochimica Polonica.* 2000; 47: 565-78.
- Staines HM, Ellory JC, Kirk K. Perturbation of the pump-leak balance for Na⁺ and K⁺ in malaria-infected erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001; 280, 1576–87.
- Stoltz WH. Ovine and caprine anaplasmosis. In: *Infectious disease of livestock.* Ed: Coetzer JAW, Tustin RC, 2nd ed. Cape Town. Oxford University Press; 2004: 617-24.
- Stuen S, Longbottom D. Treatment and control of chlamydial and rickettsial infections in sheep and goats. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2011; 27: 213-33.
- Şaki CE, Özer E. Eperythrozoonosis. *Sağ Bil Vet Derg.* 2010; 25 (2): 99 – 105.
- Talat R, Khanum T, Hayat A. Studies on mammalian haematozoan parasites of NWFP. *Pak J Biol Sci.* 2005; 8: 726-9.
- Taylor MA, Coop RL, Wall RL. *Veterinary Parasitology.* 3rd ed. USA: Blackwell Publishing. 2007: 103-15.
- Tziakas DN, Chalikias GK, Stakos D, Boudoulas H. The role of red blood cells in the progression and instability of atherosclerotic plaque. *Int J Cardiol.* 2010; 142:2–7.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol,* 2007; 39: 44-84.

- Weiss DJ, Wardrop KJ. Schalm's veterinary hematology. 6th ed. Iowa, USA: Wiley-Blackwell. 2010: 68.
- Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nguyen Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidativestress in uremia. *KidneyInt.* 1996; 49(5):1304-13.
- Woldehiwet Z. Thenaturalhistory of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Parasitol.* 2010; 167: 108-22.
- Yasini SP, Khaki Z, Rahbari S, Kazemi B, Amoli JS, Gharabaghi A, at al. Hematologic and clinical aspects of experimental ovine anaplasmosis caused by *Anaplasma ovis* in Iran. *I J P.* 2012; 7: 91-8.
- Yenerel MN. Herediter eritrosit membran anomalileri. *Hematoloji.* 2004; 2:125-30.
- Yılmaz B. Fizyoloji, Haccatepe Taş Kitapçılık Ltd. Şti. Ankara, 1984.
- Yur F, Yazar M, Değer Y, Dede S. Na⁺/K⁺ ATPase activity in sheep with natural Babesiosis. *Acta Vet Brno.* 2010; 79: 233-6.
- Zengin K, Mert H, Mert N. Catalase activity and the levels of MDA, AOPP in sheeps with subclinical mastitis. *Research in: Agricultural & Vet Sci.* 2017; 1(1): 5-11.
- Zhang G, Oleksii AS, Siew-Kim K, Ruth A, Wiertsema S, Augusto JN, et al. Plasma advanced oxidative protein products are associated with anti-oxidative stress pathway genes and malaria in a longitudinal cohort. *Malaria Journal.* 2014; 3:133-34.
- Zhao L, He B, Li KR, Li F, Zhang LY, Li XQ, et al. First report of *Anaplasma ovis* in pupal and adult *Melophagus ovinus* (sheep ked) collected in South Xinjiang, China. *Parasit Vectors.* 2018; 11(1):258.



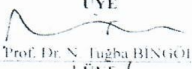
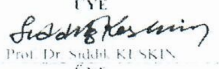

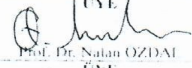
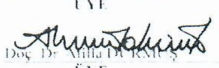

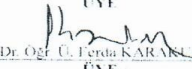





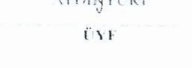

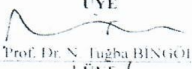
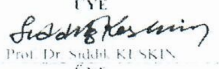

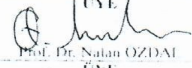
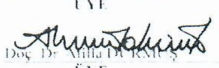

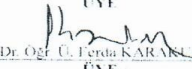





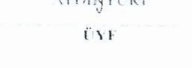

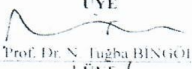
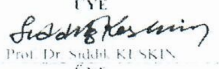

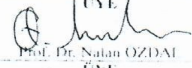
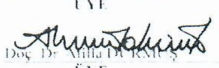

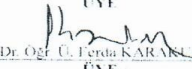





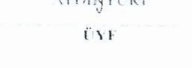
ÖZGEÇMİŞ

Salim İlkaya, 1990 yılında Diyarbakır'ın Lice ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Lice'de, lise öğrenimini ise Diyarbakır'da tamamladı. 2010 yılında Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fethiye Sağlık Yüksek Okulu'nu kazandı ve 2014 yılında mezun oldu. 2016 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Dursun Odabaş Tıp Merkezi'ne hemşire olarak atandı ve halen aynı yerde çalışmaktadır. 2017 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Programına başladı.



EKLER

Ek 1. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

	<p>T.C. YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU ONAY BELGESİ</p> <p>YUZUNCU YIL UNIVERSITY (TURKEY) ANIMAL RESEARCHES LOCAL ETHIC COMMITTEE APPROVAL CERTIFICATE</p>																		
Araştırmanın Adı <i>Title of the Research</i>	Anaplasma ovis ile doğal enfekte keçilerde eritrosit membranı lipid ve protein oksidasyonu ile Na ⁺ K ⁺ ATP az aktivitesinin değerlendirilmesi Evaluation of erythrocyte membrane lipid and protein oxidation and Na ⁺ K ⁺ ATPase activity in goat naturally infected with Anaplasma ovis.																		
Araştırıcı(lar) <i>Investigator(s)</i>	Yürütücü / <i>Chief investigator</i> : Prof. Dr. Yeter DEĞER Yardımcı Araştırıcı(lar) / <i>Co-investigator(s)</i> : Hemşire Salim İLKAYA																		
Araştırmada kullanılacak hayvanlar / <i>Animals to be used in the research</i>	Keçi/Goat																		
Tür / <i>species</i>	Rastgele seçilecek																		
Sayı / <i>Numbers</i>	182																		
Yaş / <i>Age</i>	Rastgele seçilecek																		
Cinsiyet / <i>Sex</i>	Rastgele seçilecek																		
Araştırmanın Öngörülen Başlama Tarihi / <i>Proposed Research Starting Date</i>	20.04.2018																		
Araştırmanın Öngörülen Bitiş Tarihi / <i>Proposed Research Completion Date</i>	20.04.2020																		
Dosya no / <i>File no.</i>																			
Karar:	Yukarıda bilgileri verilen planlanan araştırma projesi için Hayvan Deneyleri Etik Kurul Onayı gerekmemektedir. Tarih: 29.03/2018 ; Karar no: 2018/03																		
Decision:	The proposed research project detailed above, does not need Animal Researches Ethic Committee Approval. Date: 29.03/2018 ; Decision number: 2018/03																		
	<table border="1"><tr><td></td><td>BASKAN/CHAIR  Prof. Dr. Semiha DEDE</td><td></td></tr><tr><td>ÜYE  Prof. Dr. N. Tuğba BİNGÖL</td><td>ÜYE  Prof. Dr. Süddik KİSKİN</td><td>ÜYE  Prof. Dr. Süphü DİNİZ</td></tr><tr><td>ÜYE  Prof. Dr. Nalan OZDAL</td><td>ÜYE  Doç. Dr. Ayhan PAZARCI</td><td>ÜYE  Doç. Dr. Yıldıray B. ŞUBUĞAN</td></tr><tr><td>ÜYE  Dr. Öğr. Ü. Ferda KARAKUŞ</td><td>ÜYE  Dr. Öğr. Ü. Onur ALI AHVİRDİLYEV</td><td>ÜYE  Dr. Öğr. Ü. Cansel Yılmaz DEMİR</td></tr><tr><td>ÜYE  Dr. Öğr. Ü. İbrahim SAHİN</td><td>ÜYE  Dr. Öğr. Ü. Şakir ONALAN</td><td>ÜYE  Vet. Hek. İsmail Hakkı Bİ HÇET</td></tr><tr><td>ÜYE  Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU</td><td></td><td></td></tr></table>		BASKAN/CHAIR  Prof. Dr. Semiha DEDE		ÜYE  Prof. Dr. N. Tuğba BİNGÖL	ÜYE  Prof. Dr. Süddik KİSKİN	ÜYE  Prof. Dr. Süphü DİNİZ	ÜYE  Prof. Dr. Nalan OZDAL	ÜYE  Doç. Dr. Ayhan PAZARCI	ÜYE  Doç. Dr. Yıldıray B. ŞUBUĞAN	ÜYE  Dr. Öğr. Ü. Ferda KARAKUŞ	ÜYE  Dr. Öğr. Ü. Onur ALI AHVİRDİLYEV	ÜYE  Dr. Öğr. Ü. Cansel Yılmaz DEMİR	ÜYE  Dr. Öğr. Ü. İbrahim SAHİN	ÜYE  Dr. Öğr. Ü. Şakir ONALAN	ÜYE  Vet. Hek. İsmail Hakkı Bİ HÇET	ÜYE  Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU		
	BASKAN/CHAIR  Prof. Dr. Semiha DEDE																		
ÜYE  Prof. Dr. N. Tuğba BİNGÖL	ÜYE  Prof. Dr. Süddik KİSKİN	ÜYE  Prof. Dr. Süphü DİNİZ																	
ÜYE  Prof. Dr. Nalan OZDAL	ÜYE  Doç. Dr. Ayhan PAZARCI	ÜYE  Doç. Dr. Yıldıray B. ŞUBUĞAN																	
ÜYE  Dr. Öğr. Ü. Ferda KARAKUŞ	ÜYE  Dr. Öğr. Ü. Onur ALI AHVİRDİLYEV	ÜYE  Dr. Öğr. Ü. Cansel Yılmaz DEMİR																	
ÜYE  Dr. Öğr. Ü. İbrahim SAHİN	ÜYE  Dr. Öğr. Ü. Şakir ONALAN	ÜYE  Vet. Hek. İsmail Hakkı Bİ HÇET																	
ÜYE  Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU																			
Görüşme Tarihi / <i>Meeting Date</i>/20.....																		
İmza / <i>Signature</i>/20.....																		

Ek 2. Tez Orijinallik Raporu

	<p style="text-align: center;">T.C. VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ Sağlık Bilimleri Enstitüsü</p>	
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU		

Tarih: 11/07/2019

Tez Başlığı / Konusu: Anaplasmosisli Keçilerde Eritrosit Membranı Lipit ve Protein Oksidasyonu ile Na⁺/K⁺ ATPaz Aktivitesinin Araştırılması

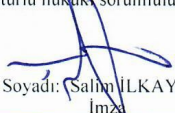
Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 32 sayfalık kısmına ilişkin, 11/07/2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezim benzerlik oranı % 19 (ondokuz) dır.

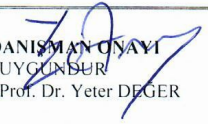
Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç.
- Teşekkür hariç.
- İçindekiler hariç.
- Simge ve kısaltmalar hariç.
- Gereç ve yöntemler hariç.
- Kaynakça hariç.
- Alıntılar hariç.
- Tezden çıkan yayımlar hariç.
- 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Salim İLKAYA
İmza: 

Öğrencinin Adı Soyadı	Salim İLKAYA
Anabilim Dalı	: Biyokimya
Öğrenci No	169301037
Programı	: <input checked="" type="checkbox"/> Yüksek Lisans <input type="checkbox"/> Doktora
DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR Prof. Dr. Yeter DEĞER	 Dr. Öğr. Üyesi Hacer Sahin ENSTİTÜ ONAYI UYGUNDUR (Unvan, Ad Soyad, İmza) 