

T.C.  
MUSTAFA KEMALÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM BALI

**ANAPLASMOSİSLİ SIĞIRLARDA ISI ŞOK PROTEİN, NİTRİK  
OKSİT (NO) VE İNTERLÖKİN (IL-6, IL-10) DÜZEYLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Sema ERGÖNÜL

**Danışman**

Yard. Doç. Dr. Tünay KONTAŞ AŞKAR

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından

BAP-07G0102 nolu proje olarak desteklenmiştir.

**HATAY-2008**

T.C.  
MUSTAFA KEMALÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM BALI

**ANAPLASMOSİSLİ SIĞIRLARDA ISI ŞOK PROTEİN, NİTRİK  
OKSİT (NO) VE İNTERLÖKİN (IL-6, IL-10) DÜZEYLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

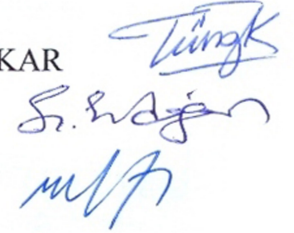
Sema ERGÖNÜL

Bu tez isimleri yazılı tez jürisi tarafından 28/11/2008 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

**Tez Jürisi:** Jüri başkanı: Yard. Doç. Dr. Tünay KONTAŞ AŞKAR

Üye: Doç. Dr. Suat ERDOĞAN

Üye: Yard. Doç. Dr. Murat GÜZEL



Bu tez, Enstitümüzün Biyokimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

...../...../.....

Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Nizami Duran

T.C.  
MUSTAFA KEMALÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM BALI

**ANAPLASMOSİSLİ SIĞIRLARDA ISI ŞOK PROTEİN, NİTRİK  
OKSİT (NO) VE İNTERLÖKİN (IL-6, IL-10) DÜZEYLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Sema ERGÖNÜL

Bu tez isimleri yazılı tez jürisi tarafından 28/11/2008 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

**Tez Jürisi:** Jüri başkanı: Yard. Doç. Dr. Tünay KONTAŞ AŞKAR  
Üye: Doç. Dr. Suat ERDOĞAN  
Üye: Yard. Doç. Dr. Murat GÜZEL

Bu tez, Enstitümüz.....Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

...../...../.....

Enstitü Müdürü  
Doç. Dr. Nizami Duran

## **TEŞEKKÜR**

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni yönlendiren ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Yard. Doç. Dr. Tünay Kontaş Aşkar' a, çalışmalarımnda yardımcı olan hocam Doç. Dr. Suat Erdoğan'a, protozoolojik analizleri gerçekleştirerek çalışmamda yardımcı olan Doç. Dr. Galip Kaya'ya, desteklerinden dolayı Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine, laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen bütün arkadaşlarıma ve biricik aileme çok teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
TABLolar DİZİNİ	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT	X
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1.Anaplasmosis	2
2.1.1.Tarihçe	2
2.1.2.Anaplazma türlerinin genel biyolojisi	3
2.1.3.Anaplazma etkenlerinin taşınması	4
2.1.3.1.Mekanik taşınma	4
2.1.3.2.Biyolojik taşınma	4
2.1.4.Anaplasmosisin hastalık evreleri	5
2.1.4.1.İnkübasyon evresi	5
2.1.4.2.Gelişme evresi	5
2.1.4.3.İyileşme evresi	6
2.1.4.4.Taşıma evresi	6
2.1.5.Anaplasmosin klinik belirtileri	6
2.1.6.Anaplasmosiste biyokimyasal çalışmalar	7
2.1.7.Anaplasmosisin teşhisi	7
2.1.7.1.Klinik tanı	7
2.1.7.2.Mikroskopik tanı	8
2.1.7.3.Serolojik tanı	8
2.1.8.Anaplasmosiste bağışıklık	8
2.2.Oksidatif stres ve lipit peroksidasyonu	9
2.2.1.Nitrik oksit	11
2.2.1.1.Nitrikoksit sentetaz (NOS) enzimi	12
2.2.1.2.Nitrikoksidin vücuttaki etkileri	13
2.3.Isı şok proteinleri	15
2.3.1.Isı şok proteinlerin çeşitleri	15
2.3.2.Isı şok proteinlerin artışına sebep olan faktörler	17
2.3.3.Isı şok proteinlerin önemi	17
2.3.4.Isı şok proteinleri ve bağışıklık	17
2.3.5.Isı şok proteinlerin Anaplasmosisteki rolü	18

2.4.Sitokinler	18
2.4.1.Interlökin-6 IL-6	20
2.4.2.Interlökin-10 IL-10	21
2.4.2.1.IL-10'nun Etki Mekanizması	23
2.5.Amaç	24
3.GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1.Gereç	25
3.2.Protozoolojik ve Biyokimyasal analizler	25
3.2.1.Kan frotisinin hazırlanması ve boyanması	25
3.2.2.Malondialdehit (MDA) Analizi	25
3.2.3.Nitrik oksit (NO) Düzeylerinin Belirlenmesi	26
3.2.4.Plazma HSP-27 Düzeyinin Belirlenmesi	26
3.2.5.Serum IL-6 Düzeyinin Belirlenmesi	26
3.2.6.Serum IL-10 Düzeyinin Belirlenmesi	27
3.2.7.İstatistiksel Analizler	27
4.BULGULAR	28
5.TARTIŞMA	31
6.SONUÇ	35
7.KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ	42

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Anaplazma etkenlerinin genel biyolojisi.....	3
Şekil 2.2. <i>A. marginale</i> ile enfekte sığır alyuvarları.....	5
Şekil.2.3. Oksidatif stres mekanizması.....	10
Şekil 2.4. L-argininden NOS katalizörlüğünde NO ve sitrulin üretimi.....	11
Şekil 2.5. Nitrik oksitin sentezi-inhibisyonu ve etki mekanizması.....	13
Şekil 2.6. IL-10' un inhibe ettiği moleküller.....	22
Şekil 4.1. Kontrol grubu ve Anaplasmosisli sığırlarda (Hasta grubu) plazma MDA düzeyleri.....	28
Şekil 4.2. Kontrol grubu ve Anaplasmosisli sığırlarda (Hasta grubu) plazma NO düzeyleri.....	29
Şekil 4.3. Kontrol grubu ve Anaplasmeosisli sığırlarda (Hasta grubu) serum Hsp düzeyleri.....	30
Şekil 4.4. Kontrol grubu ve Anaplasmosisli sığırlarda (Hasta grubu) serum IL-6 düzeyleri.....	30

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge.1.</b> Hsp çeşitleri.....	16
<b>Çizelge.2.</b> İnterlökin çeşitleri ve fonksiyonları.....	19
<b>Çizelge.3.</b> IL- 6' nın hücrel kaynakları ve etkilediği hücreler.....	21
<b>Çizelge.4.</b> IL-10' nun hücrel kaynakları ve etkilediği hücreler.....	23
<b>Çizelge.5.</b> Kontrol grubu ve hasta grubu (Anaplasmosisli sığırlar)' nun MDA, NO, HSP-27, IL-6 ve IL-10 düzeyleri.....	29



## SİMGELER VE KISALTMALAR

IFN- $\alpha$ :	İnterferon alfa
IL-1:	İnterlökin -1
IL-4:	İnterlökin -4
IL-8:	İnterlökin -8
IL-12:	İnterlökin -12
IL-13:	İnterlökin -13
OONO <sup>•</sup> :	Peroksinitrit
LPS:	Lipopolisakkarit
IFAT:	Immuno Florasan Antibody Testi
ELISA:	Enzim Bağlayıcı Immuno Sorbent Testi
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ROS:	Reaktif oksijen radikali
MDA:	Malondialdehit
kDA:	Kilodalton
IL-10:	İnterlökin -10
IL-6:	İnterlökin -6
TBA:	Tiyobarbitürik asit
NaOH:	Sodyum hidroksit
mM:	Mikromolar
NaCl:	Sodyum klorür
nM:	Nanomolar
PEG:	Polietilen glikol
HSDA:	Dimetoksianilin
Ig G-HRP:	Anti-rabbit enzimi
ALT:	Alanine aminotransferaz
AST:	Aspartat aminotransferaz
ALP:	Alkalın fosfat
NO:	Nitrik oksit
GC:	Guanilat siklaz
DNA:	Deoksiribonükleikasit
c-GMP:	Siklik guanozin monofosfat
BUN:	Kan üre nitrojen
TSP:	Total serum protein
TBIL:	Serum total bilirubin
DBIL:	Direk bilirubin
SUN:	Serum üre nitrojen
NHA:	N-Hidroksi-L-Arginin
NOS:	Nitrik oksit sentetaz
Ca:	Kalsiyum
TNF- $\alpha$ :	Tümör Nekroz Faktör-alfa
CF:	Komplement Fiksasyon
CAT:	Kard Aglutinasyon Testi
IFN- $\gamma$ :	İnterferon gama

## ÖZET

### **Anaplasmosisli Sığırlarda Isı Şok Protein, Nitrik Oksit (NO) Ve İnterlökin (IL-6, IL-10) Düzeylerinin Araştırılması**

Kan parazit hastalıkları sığırlarda sıklıkla görülmekte olup, Türkiye’de de oldukça yaygındır. Bu hastalıklardan tropikal theileriosis en yaygın görülen kan paraziti hastalığıdır. Babesiosis ve anaplasmosis ise diğer önemli kan paraziti hastalıklarındandır. Anaplasmosis Türkiye’de her bölgede görülmektedir.

Bu çalışmada anaplasmosisli sığırlarda oksidatif stres ve immun sistem değişimlerinin ısı şok protein (Hsp-27), malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO), interlökin-6 (IL-6) ve interlökin-10 (IL-10) parametreleri ile ortaya konulması amaçlanmaktadır. Çalışma, 1-3 yaş arasında 15 sağlıklı ve 15 anaplasmosisli sığırdan gerçekleştirilmiştir. Çalışmada plazma malondialdehit ve nitrik oksit düzeyleri spektrofotometrik yöntemler ile, ısı şok protein-27 ve interlökin (IL-6 ve IL-10) düzeyleri ise ticari ELİSA kitleri kullanılarak belirlenmiştir.

Anaplasmosisli sığırlarda plazma malondialdehit ( $p<0.001$ ), nitrik oksit ( $p<0.01$ ), ısı şok protein 27 ( $p<0.01$ ) ve interlökin-6 ( $p<0.001$ ) düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Serum interlökin-10 aktivitesinde ise, kontrol grubu ile anaplasmosisli sığırlar arasında önemli bir fark bulunamamıştır. Elde edilen sonuçlara göre, anaplasmosiste malondialdehit, nitrik oksit, ısı şok protein-27 ve interlökin-6 düzeylerinin belirlenmesi, hastalığın tanısı ve prognozunun takip edilmesinde faydalı olabileceği kanısına varılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** Anaplasmosis, Sığır, Nitrik oksit, Isı Şok Protein, İnterlökin

## **ABSTRACT**

### **The Investigation of Heat Shock Protein (Hsp 27), Nitric Oxide (NO) and Interleukin (IL-6, IL-10) Levels in Cattle Anaplasmosis**

Blood parasitic diseases such as tropical theileriosis in cattles are observed in Turkey. On the other hand, babesiosis and anaplasmosis are other primer tick-borne diseases. Anaplasmosis is generalised in all over the region of Turkey.

In the present study, we aimed to reveal the alterations of immun system and oxidative stress in cattles with anaplasmosis by analysing heat shock protein (Hsp 27), nitric oxide (NO), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10) levels. The research has been performed on 15 healthy and 15 cattles with anaplasmosis, aged 1-3 years old. The plasma levels of malondialdehyde and nitric oxide were determined by spectrophotometric methods while the concentrations of heat shock protein and interleukin (IL-6 and IL-10) were detected by using commercial ELISA kits.

The levels of plasma MDA ( $p<0.001$ ), NO ( $p<0.001$ ), Hsp 27 ( $p<0.01$ ) and IL-6 levels were determined significantly higher in cattles with anaplasmosis than the control group. The levels of serum IL-10 was not showed significant differences between the control and the patient group. In conclusion, determination of the levels of malondialdehyde, nitric oxide, heat shock protein-27 and interleukin-6 might be a valuable indicator for diagnosis and prognosis of cattle anaplasmosis.

**Key words:** Anaplasmosis, cattle, nitric oxide, heat shock protein, interleukin.

# 1. GİRİŞ

Anaplasmosis tropik ve subtropik bölgelerde görülen yüksek ateş, makrositer, hipokrom anemi ile karakterize, hem transovarial hem de transstadial olarak nakledilen protozoer bir hastalıktır. Sığırlarda anaplasmosise sebep olan anaplasma türleri *Anaplasma marginale* ve *Anaplasma centrale* 'dir. *A.marginale A.centrale* 'ye göre daha patojendir (Wilkinson 2005). Anaplasma türleri *Boophilus*, *Rhipicephalus*, *Hyalomma*, *Ixodes* ve *Dermocentor* ailelerine bağlı 14 farklı kene türü tarafından taşınmaktadır (Anonim 2007).

Anaplasmosis tedavisi güç bir hastalıktır. Çünkü hastalığı geçiren hayvanlar hastalığa karşı uzun süre bağışıklık kazanır. Bu bağışıklığın özelliği hastalık geçtiği halde bir miktar parazitin organizmada kalması, iç organlarda yaşamaya devam etmesidir. Hayvan bu nedenle portör konumundadır.

Yurdumuzda sığırlarda anaplasmosis diğer kan paraziti hastalıkları gibi yaygın olarak görülmektedir. Yerli sığır ırklarında mortalite oranı düşüktür. Kültür ırklarında ise mortalite oranı %10–60 arasında değişmektedir. Hatay yöresinde sığırlarında ise daha çok hastalığa *A.marginale* sebep olmaktadır (Mimioğlu ve ark. 1969).

Anaplasmosis ile biyokimyasal çalışmalar sınırlı sayıdadır. *A.marginale* enfeksiyonu ile sığırlarda çeşitli biyokimyasal değişimler meydana geldiği belirlenmiştir. Allen ve ark. (1981) *A. marginale* enfeksiyonunda serum total bilirubin (TBIL), direct bilirubin (DBIL), serum üre nitrojen (SUN), alkalın fosfat (ALP) ve serum aspartat aminotransferaz (AST) düzeylerinde artış olduğunu belirlemişlerdir. Anaplasmosiste meydana gelen biyokimyasal değişimler, diğer kan paraziti hastalıklarında da meydana gelmektedir. Bu nedenle hastalığın prognozunda yardımcı olacak, daha spesifik biyokimyasal parametrelere ihtiyaç vardır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Anaplasmosis

Anaplasmosis tropik ve subtropik bölgelerde görülen yüksek ateş ve anemi ile karakterize edilen, transovarial ve transstadial olarak nakledilen protozoer bir hastalıktır (Kocan 2000). Anaplasmosis, *Rickettsia*'ların *Anaplasmatacea* ailesinde yer alan, anaplasma etkenleri tarafından meydana getirilir (Anonim 2007). Anaplasma etkenleri sığır, koyun, keçi ve bazı yabani ruminantların eritrositlerinin içerisinde 0,3- 1 mikron büyüklükte nokta şeklinde sitoplazmasız organizmalardır (Bock ve ark. 2001).

Sığırlarda anaplasmosise sebep olan anaplasma etkenleri *Anaplasma marginale* ve *Anaplasma centrale* 'dir. *A. marginale* eritrositlerin kenar kısmında (%30), *A. centrale* ise orta kısmında (%70) bulunur. *A. marginale*, *A. centrale*'ye göre daha patojendir (Wilkinson 2005). Anaplasmosis sığırlarda tüm yaşlarda görülebilir. Ancak yaş ilerledikçe hastalığın şiddeti artar. 6 aylık ve daha küçük sığırlarda hastalık belirtisi nadiren görülürken, 6 ay ile 3 yaş arasındaki sığırlarda hastalık artma ve hatta ölüm görülür. 3 yaşından büyük sığırlarda ise ölüm oranı %30 ila 50'dir (Mimioğlu ve ark. 1969).

#### 2.1.1. Tarihçe

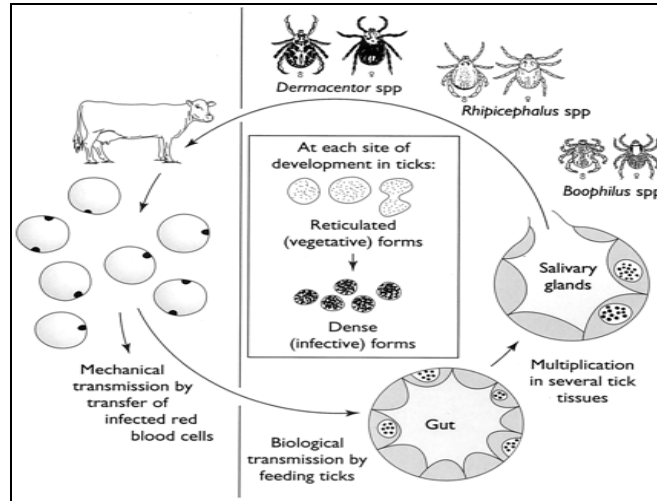
İlk kez 1893 yılında Smith ve Kilborne sığır piroplasmosisi üzerinde çalışırken alyuvarların kenarında rastladığı küçük cisimciklere 'periferik küçük cisimcikler' adını vermiştir. Daha sonra Hutcheon'un 1887'de Güney Afrika'da yaygın olan hastalığa safra humması veya sarılık adını vermiştir. Theiler 1908 yılında alyuvarların kenarında rastlanan sitoplazmadan yoksun cisimciklere ilk defa anaplasma adını vermiştir. Theiler, çapraz bağışıklık denemeleriyle anaplasmosisin iki tip etkenden ileri gelen bir hastalık olduğunu açıklamıştır. 1911 yılında alyuvarların kenarlarında olan etkenleri *Anaplasma marginale* olarak isimlendirmiştir. Yakimov ve Beliavine 1926 yılında Rusya'da buldukları sığır anaplasmalarına *Anaplasma rossicum*, Lignieres ise Arjantin'de sığırlarda rastladığı anaplasma etkenlerine *Anaplasma argentium* adını vermişlerdir. Sonra birçok araştırmacı çeşitli ülkelerde anaplasmosisin varlığını işaret etmişlerdir (Mimioğlu ve ark. 1969).

Ülkemizde sığır anaplasmosisi ilk defa Rıza İsmail tarafından 1926 yılında Karacabey Harasında tespit etmiş, daha sonra Lestoquard 1931 yılında Bursa çevresinde hastalığın varlığını bildirmiştir.

### 2.1.2. Anaplasma türlerinin genel biyolojisi

Keneler kan emme sırasında anaplasma etkenleri ile enfekte alyuvarları alarak enfekte hale gelirler. Kenelerde *A. marginale* enfeksiyonunun ilk yerleşim alanı bağırsak hücreleridir. Kene bağırsak hücrelerindeki *A. marginale*'nin gelişiminin ardından, tükürük bezleri de dahil olmak üzere diğer bir çok kene dokusu enfekte olur (Kocan ve ark. 2003).

Kenelerde *A. marginale* zarla çevrili kofullarda veya kolonilerde gelişir. *A. marginale*'nin kolonide görülen ilk hali, ikili fisyon bölünmesi yapacak şekilde görünen vejetatif formdur, bu şekliyle yüzlerce organizma içeren büyük koloniler oluşturabilir. Daha sonra etken enfekte kene hücresi dışında da yaşayabilen ve daha yoğun olan enfektif forma dönüşür. Kene ikinci kez beslendiği zaman enfektif formu, tükürük bezleri ile sığırda nakleder, böylece sığır *A. marginale* enfeksiyonunu kapmış olur (Richey ve Palmer 2003). Anaplasma etkenleri sığırda kırmızı kan hücrelerine yerleşir. Trombositler anaplasmaların alyuvarlara taşınmasında etkilidir. Daha sonra bunlar anaplasma etkenleri tarafından tahrip edilir ve buna bağlı olarak trombosit yapımında artış görülür (Kocan ve ark. 2003).



Şekil 2.1. Anaplasma etkenlerinin genel biyolojisi (Kocan ve ark. 2003)

### **2.1.3. Anaplasma Etkenlerinin Taşınması**

*A. marginale* sivrisinek ısırması veya etkenle bulaşmış kan nakli araçları ile mekanik olarak taşınabildiği gibi, keneler tarafından biyolojik olarakta nakledilebilir (Kocan 1986).

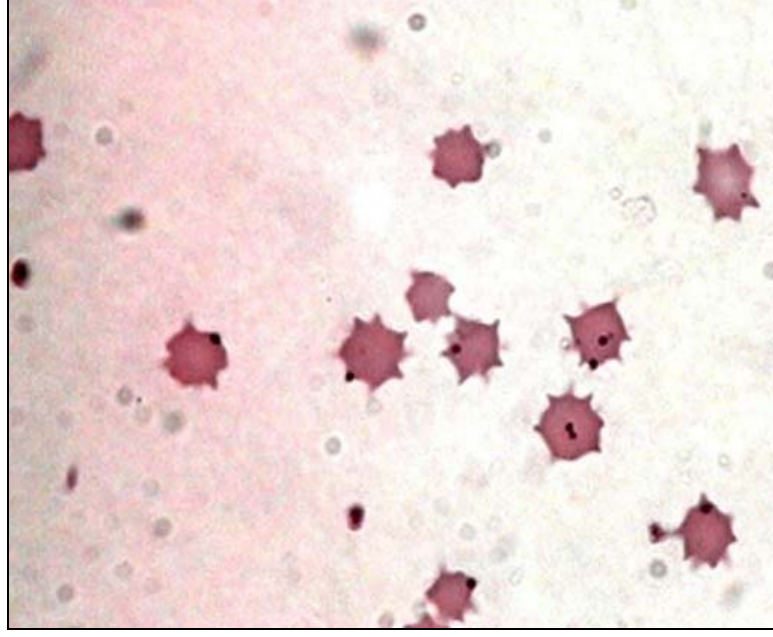
#### **2.1.3.1 Mekanik Taşıma**

Mekanik taşıma sıklıkla enjektör, boynuz testeresi, burun maşası, damgalama ve kulak işaretleme ve hadım etme araçları gibi kirli kan taşıyıcı araçlar ve tabanus sinekleri ile sivrisinekler aracılığıyla gerçekleşir (Potgieter 1981; Foil 1989; Figueroa ve ark. 1998).

Ayrıca ek olarak, *A. marginale* gebelik sırasında sığırdan buzağıya da taşınabilir. Anaplasmosisin plasental taşınması, bu hastalığın epidemiyolojisine dolaylı da olsa katkıda bulunmaktadır (Wren 2000).

#### **2.1.3.2 Biyolojik Taşıma**

*A. Marginale*'nin biyolojik nakli Dermacentor, Rhipicephalus ve Boophilus keneleri tarafından gerçekleştirilir. Yaklaşık 14 çeşit kene “vektor” olarak tanımlanmıştır (Anonim 2007). Kenelerle etkenin nakli transstadial olarak gerçekleşir, transovaryal nakil görülmez (Stich 1998). *A. marginale*'nin intrastadial taşınması erkek keneler tarafından gerçekleştirilir. Son çalışmalar göstermiştir ki, erkek Dermacentor kenesi *A. marginale*'nin biyolojik taşınmasında önemli bir rol oynamaktadır (Kocan ve ark. 2000).



**Şekil 2.2.** *A. marginale*. ile enfekte sığır alyuvarları (Fox 2008)

#### **2.1.4. Anaplasmosisin hastalık evreleri**

Anaplasmosisin hastalık evrelerini 4 ana gruba ayırmak mümkündür (Stokka ve Falkner 2000).

##### **2.1.4.1. İnkübasyon Evresi**

Bu evre konağın kene tarafından enfekte edilmesi ile başlar ve kırmızı kan hücrelerinin %1'i anaplasma etkenleri tarafından istila edilene kadar sürer. Ortalama inkübasyon evresi 3 ila 8 haftadır ve hastalıkla ilgili herhangi bir belirti görülmez. İnkübasyon evresi boyunca konağın kanında anaplasma etkeni yavaş yavaş ürer. Bu evre sonunda etken konağın kırmızı kan hücrelerine yerleşir (Hopkins ve ark. 2004).

##### **2.1.4.2. Gelişme Evresi**

Gelişme evresi 4 ila 9 gün sürer ve bu evrede konak anaplasmosisin karakteristik özelliklerini gösterir. Klinik belirtiler bu evrede görülmeye başlar. Hasta olan hayvanın vücut savunma sistemi paraziti parçalarken, eritrositleri de parçalar. Bu nedenle



eritrositlerde önemli kayıplar meydana gelir. Bu da hayvanda klinik aneminin görülmesine neden olur. Vücut sıcaklığı genellikle 40-41 °C'dir. Ayrıca ineklerde süt veriminde azalma görülür. Sığır üreticileri anaplasmosis bulaşmış hayvanlarda ilk belirtilerin anemi olduğunu ve hayvanın sürünün gerisinde kalıp güçsüzleştiğini belirtmişlerdir. Burun, dudak, göz ve meme başı etrafındaki deri soluklaşır. Daha sonra hasta hayvanda kabızlık, kilo kaybı ve telaş görülür. Hastalığın ilk belirtilerinden 1-4 gün sonra hayvan ölebilir. Genel kanı gelişme evresinin başlarında anaplasmosis fark edilmezse hayvanın tedavi edilemeyeceği yönündedir (Stokka ve Falkner 2000). Klinik belirtilerin görüldüğü evrede *A.marginale* ile enfekte olmuş sığırlarda serum total bilirubin (TBIL), direk bilirubin (DBIL), serum üre nitrojen (BUN), alkalın fosfataz (ALP) ve serum aspartat aminotransferaz (AST) düzeylerinde artış meydana gelir (Allen 1981).

#### **2.1.4.3. İyileşme Evresi**

Bu evre kan hacminin normal değerlerine dönünceye kadar sürer. Bu evrede periferik kanda eritrositlerin üretimi gerçekleşir ve hemoglobin düzeyinde artış görülür. Ayrıca total beyaz kan hücrelerinde de artış meydana gelir. Anaplasmosisin sebep olduğu ölümler gelişme evresinin sonunda veya iyileşme evresinin başında görülür. Anaplasmosiste hastalığın klinik evresinde değişim gösteren biyokimyasal bazı parametrelerin tedavi sonrası değişimleri hakkında herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Fakat diğer kan paraziti hastalıklarında tedavi sonrasında görülen biyokimyasal değişimlerle (Cunha ve ark. 2000; Kontaş ve ark. 2008) benzerlik göstereceği düşünülmektedir.

#### **2.1.4.4. Taşıma Evresi**

Taşıma evresinde sığırlarda herhangi bir hastalık belirtisi görülmezken, hayvan hastalık etkeninin taşıyıcısı konumundadır. Bu nedenle taşıyıcı hayvanlar sürü içinde hastalığın bulaşmasında etkilidirler (Hopkins ve ark. 2004).

#### **2.1.5. Anaplasmosisin klinik belirtileri**

Sığırlarda *A.marginale*'nin enfeksiyona sebep olduğu tek yer alyuvarlardır. Bu hücreler, sitoplazmalarında 4-8 adet *A. marginale* etkeni bulundurabilir. Enfeksiyonun

kuluçka süresi ortalama 28 gündür ve bu süre enfekte organizmaların sayısına bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Etkenle enfekte olmuş alyuvarların sayısı geometrik olarak artmaya başlar. Bir süre sonra parazitlerin bulaştığı alyuvarlar sığırların retikuloendotelyal hücreleri tarafından parçalanır. Bu süreç anemi ve hemoglobinemide veya hemoglobininuri ve sarılıkla sonuçlanır. Klinik semptomlar yüksek ateş (41-42°C), kilo kaybı, uyuşukluk ve sarılığı içerir. 2 yaşından büyük hayvanlarda sıklıkla ölüm görülür. Daha önce enfekte olmuş veya “taşıyıcı” sığırlar ömür boyu bağışıklık kazanırlar ve *A.marginale* için rezervuar görevi görürler. Böylece keneler tarafından gerçekleştirilen hem mekanik hem de biyolojik taşıma için enfekte olmuş kan kaynağı sağlarlar. Danalar *A.marginale* enfeksiyonuna karşı daha az duyarlıdır (Kocan ve ark. 2003).

#### **2.1.6. Anaplasmosiste biyokimyasal çalışmalar**

*A.marginale* ile enfekte olmuş sığırlarda akut enfeksiyonda serum total bilirubin (TBIL), direk bilirubin (DBIL), serum üre nitrojen (BUN), alkaline fosfat (ALP) ve serum aspartat aminotransferaz (AST) düzeylerinde artış meydana geldiğini Allen ve ark. (1981) göstermiştir.

Diğer kan paraziti hastalıklarından olan theileriosis ve babesiosis ile yapılan çalışmalarda da benzer şekilde alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), alkaline fosfat (ALP), kreatin, kan üre nitrojen (BUN), total protein (TP), albumin ve kan glukoz konsantrasyonlarında artış tespit edilmiştir. Transaminaz ve ALP aktiviteleri artışının, karaciğer yetmezliğine bağlı olduğu ve bu nedenle hipoalbuminemi ve hipoglisemi meydana geldiği gösterilmiştir (Ozan ve ark. 1999; Zygner ve ark. 2007; Kızıl ve ark. 2007). Grab ve ark. (2007) *Anaplasma phagocytophilum* enfeksiyonunda hastalığın karaciğer hasarına neden olduğunu göstermişlerdir.

#### **2.1.7. Anaplasmosisin Teşhisi**

Anaplasma enfeksiyonlarının tanısında klinik, mikroskopik ve serolojik yöntemler uygulanmaktadır.

### **2.1.7.1. Klinik Tanı**

Hastalığın görüldüğü bölgelerde, hayvanlarda 41-41 °C ateş, kilo kaybı, uyuşukluk ve sarılığı içerir. 2 yaşından büyük hayvanlarda sıklıkla ölüm görülür (Stokka ve Falkner 2000).

### **2.1.7.2. Mikroskopik Tanı**

Mikroskopik tanıda kan frotileri ve lenf bezi biyopsisinden yararlanılır. Alınan örnekler Giemsa ile boyanır ve yapılan mikroskopik incelemelerde eritrositlerde anaplasma etkenleri aranır. Mikroskopik incelemede *A. marginale* eritrositlerin kenar kısmında (%30), *A. centrale* ise orta kısmında (%70) görülür (Mimioğlu ve ark. 1969).

### **2.1.7.3. Serolojik Tanı**

Anaplasma enfeksiyonunu teşhis etmek amacıyla birçok serolojik testten yararlanılmaktadır. Bu amaçla en çok Enzim Bağlayıcı Immuno Sorbent Testi (ELISA), Komplement Fiksasyon (CF) ve Kart Aglutinasyon Testi (CAT) dolaşımdaki antikorları teşhis etmek amacıyla kullanılmaktadır (Reyna-Bello ve ark. 1998). Son yıllarda moleküler biyolojideki gelişmelerle birlikte, hastalık etkenlerinin DNA'sını ortaya koymaya yönelik olarak PCR (Polymerase Chain Reaction, Polimeraz Zincir Reaksiyonu) kullanılmaya başlanmıştır (Bock ve ark. 2006).

### **2.1.8. Anaplasmosiste Bağışıklık**

Tek hücreli olmalarından dolayı protozoonlara karşı oluşan immunolojik reaksiyonlar bakterilerdekine benzemektedir. Bakteriyel enfeksiyonlarda olduğu gibi, protozoon enfeksiyonlarında da humoral veya hücrel reaksiyonlar görülmekte, nadiren ikisi birden ortaya çıkmaktadır. *A. marginale*'ye karşı bağışıklığın temeli çok iyi anlaşılmiş olmamasına rağmen, anaplasmosiste hücrel bağışıklık görülmektedir (Gale ve ark. 1997).

Interferon gama (IFN- $\gamma$ ), hücre içi bakteriler ve protozonlar gibi- riketsiyalar da dahil olmak üzere- geniş bir patojene karşı yardımcı T-lenfositler tarafından üretilen, pleotropik etkileri olan bir sitokindir. IFN- $\gamma$ ' ların yüksek düzeyde üretimi, *A. marginale* karşı gelişen lenfosit cevabı sırasında meydana gelir. IFN- $\gamma$  aynı zamanda bağışıklığı

etkisiz hale getiren bir molekül olan NO üretimi için makrofajların aktivasyonu sağlar (Gale ve ark. 1997).

## 2.2. Oksidatif Stres ve Lipid Peroksidasyonu

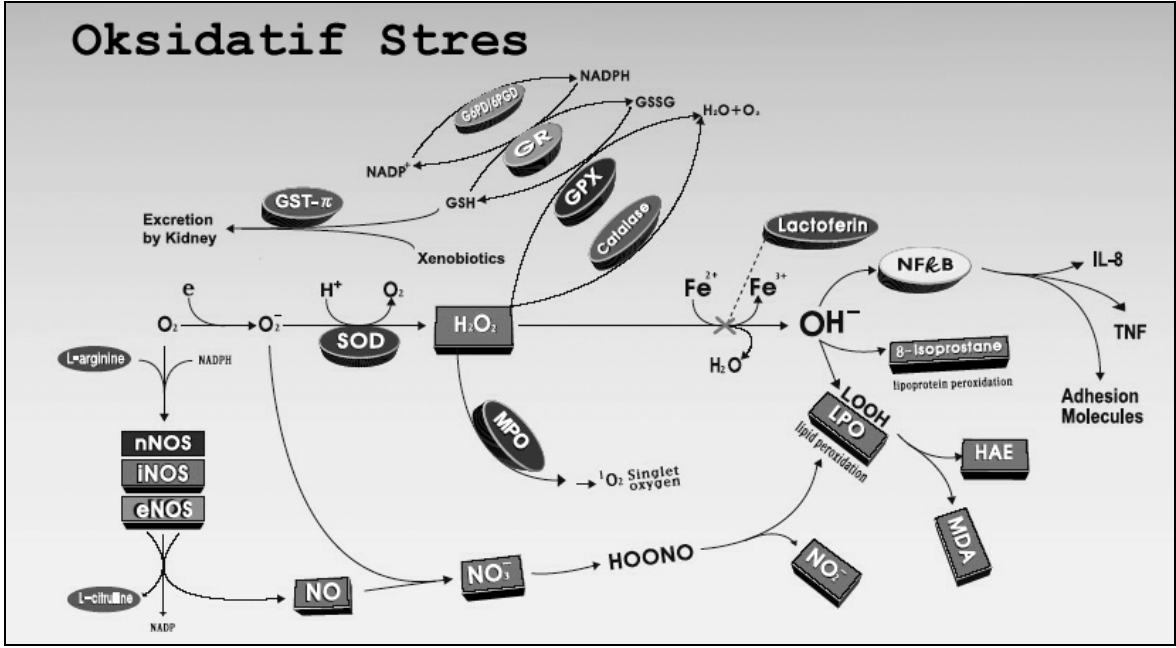
Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. 'Oksidatif stres' olarak adlandırılan bu durum özetle: serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (Altan ve ark. 2006).

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler. Endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olabilirler (Ramiro-Puiq ve ark. 2007).

Endojen antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon s-transferazlar (GST), katalaz (CAT), mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, hidroperoksidaz gibi antioksidan enzimler ve Melatonin, Seruloplazmin, Transferrin, Miyogloblin, Hemogloblin, Ferritin, Bilirubin, Glutatyon, Sistein, Metiyonin, Ürat, Laktoferrin, Albümin gibi enzim olmayan moleküllerdir (Nquemfo ve ark. 2008).

Eksojen antioksidanlar ise,  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E),  $\beta$ -karoten, Askorbik asit (vitamin C), Folik asit (folat) gibi vitaminler, sitokinler (TNF ve IL-1), demir şelatörleri ve Butylated hydroxytoluene (BHT) Butylated hydroxyanisole (BHA) Sodyum benzonat gibi gıda antioksidanlarıdır (Ramiro-Puiq ve ark. 2007).

Serbest radikaller dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküllerdir. Kısa ömürlü olmalarına rağmen; bir dizi zincir reaksiyonu başlatıp birçok radikal oluşturabilirler (Köken ve ark. 2002). Serbest radikaller hidroksil radikali, süperoksit radikali, nitrik oksit ve lipid peroksid radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir (Mercan 2004).



**Şekil.2.3.** Oksidatif Stres mekanizması (Altan ve ark. 2006)

Reaktif oksijen türleri (ROS) kontrolsüz bir şekilde üretildiğinde, nükleik asit, protein ve lipid gibi biyomolekülleri oksitler ve genetik bilginin (DNA) değişmesine, protein yapısının bozulmasına, enzim aktivitesinin engellenmesine ve hücrel membranların hasar görmesine lipidlerde peroksidasyonuna neden olur (Clarkson ve Thompson 2000).

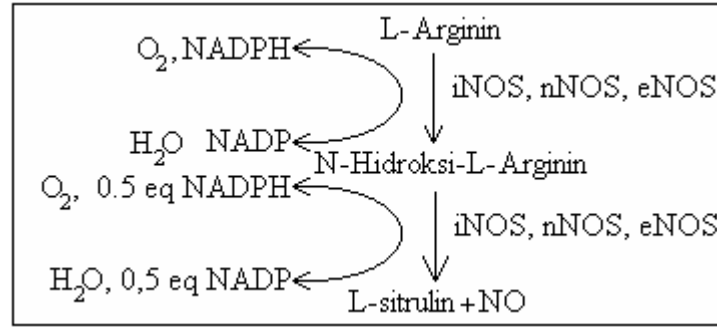
Lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehydler üreterek, diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olur. Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü malondialdehid (MDA) dir. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda MDA meydana gelir. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliği nedeniyle, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir (Mercan 2004).

### 2.2.1. Nitrik Oksit

Nitrik oksit (NO) vücutta hem fizyolojik, hem de patolojik olgulara aracılık eden serbest bir radikaldir. Atmosferde yaygın olarak bulunan azot (N) ve oksijen (O) gazlarının bileşiminden oluşmuş bir azot monoksit gazıdır. Gaz fazında renksiz, standart ısı ve basınçta suda çözünebilen bir moleküldür (Archer 1993; Erel ve ark. 1999).

Nitrik oksit, üzerinde yük taşımaması ve ortaklanmamış elektron bulundurması, hücreden hücreye hiçbir bariyerle karşılaşmadan kolaylıkla geçmesini sağlamaktadır. Aynı zamanda NO, taşıdığı ortaklanmamış elektron nedeniyle bir serbest radikal molekülü olarak isimlendirilir (Knows ve ark. 1991).

Nitrik oksit, L-argininin nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimi ile oksidasyonundan meydana gelir (Ozkan ve Dweik 2001; Moncada ve Higgs 2002). Nitrik oksit sentaz tarafından katalizlenen bu reaksiyon iki basamaklıdır. Birinci basamakta argininin iki elektron oksidasyonundan, NADPH ve O<sub>2</sub> kullanılarak, bir ara ürün olan N-Hidroksi-L-Arginin (NHA), daha sonraki basamakta ise, NHA'dan NO ve sitrulin oluşur (Özkan ve Yüksekol 2003).



Şekil 2.4. L-argininden NO ve sitrulin oluşumu (Howe ve Boothe 2001).

Bütün memeli hücreleri tarafından sentezlenebilen NO, kan damarları geriliminin düzenlenmesinden, sinirler arası iletişime ve savunma sistemine kadar pek çok fizyolojik olayda anahtar görevi gören bir moleküldür (Granger ve Stokes 2000). NO'nun yarı ömrü 22-30 saniyedir. Kolayca düz kasa geçerek Guanilat Siklaz (GC) enziminin 'hem' demirine bağlanır ve cGMP sentezini uyarıp damar gevşemesini uyarır (Harmankaya ve ark. 2001; Tutluoğlu ve ark. 2000).

### 2.2.1.1. Nitrik Oksit Sentetaz (NOS, E.C. 1.14.13.39 )

NOS Ca bağımlı bir enzimdir. Hücre içi iyonize  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunun arttığı durumlarda,  $Ca^{+2}$  kalmodulinle birleşerek NOS enzimini aktive eder ve L-argininden NO sentezi gerçekleşir (Selleri ve Maciejewski 2001). NOS' un 3 izoenzimi vardır:

1. Sinir ve bazı hücre tiplerinde (akciğer, pankreas, mide, uterus) fizyolojik olarak görülen nöronal NOS (nNOS, NOS1)
2. İmmünolojik uyarıyla indüklenen ve bütün çekirdekli hücrelerde bulunan indüklenebilir NOS (iNOS, NOS2)
3. Endotel hücrelerinde fizyolojik olarak bulunan endotelial NOS (eNOS, NOS3)

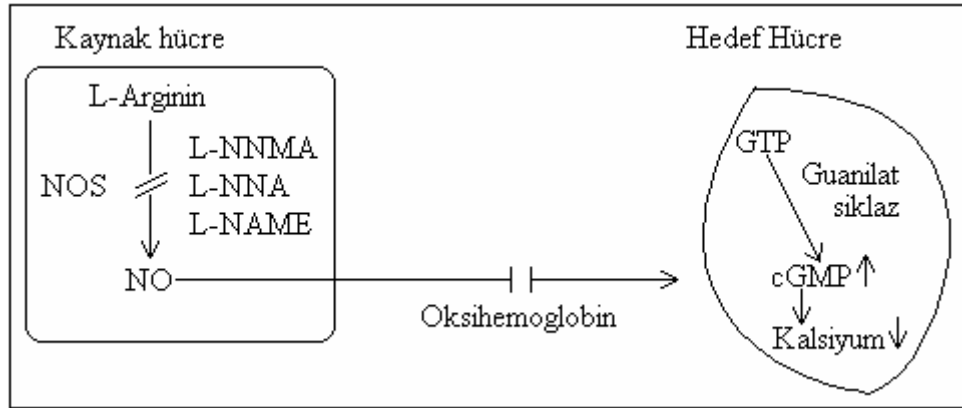
Nöronal NOS (nNOS) ve endotelial NOS (eNOS) fizyolojik aktivite düzeylerine sahiptirler. Hücre içi iyonize  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunun arttığı durumlarda  $Ca^{+2}$  kalmodulinle birleşerek, NOS enzimini aktive eder ve L-argininden NO sentezi gerçekleşir (Erel ve ark. 1999; Selleri ve Maciejewski 2001).

İndüklenebilir NOS (iNOS) normal durumlarda aktivite göstermez. Yangı ve enfeksiyon sırasında salınan sitokinler ve endotoksinler tarafından uyarılır. iNOS  $Ca^{+2}$  ve kalmoduline bağımlı değildir. Makrofajlar, nötrofiller ve mast hücrelerinde NO sentezini sağlar. iNOS tarafından üretilen nitrik oksitin kaynağı spesifik olmayan savunma mekanizması olup, antimikrobiyel ve antitümoral etkiye sahiptir. Aktivitesinin sepsis, astım, romatoid artrit, tüberküloz, doku reddi, multiple skleroz gibi pek çok hastalıkta da arttığı gösterilmiştir. Yapılan deneysel çalışmalarda interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), tümör nekroz faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) ve lipopolisakkaritlerin iNOS' u stimule ederek NO sentezinin arttıkları ve yabancı hücrelerde (bakteri, parazit, tümör hücresi) sitostatik ve sitotoksik etki meydana getirdiği bildirilmiştir (Shoda ve ark. 2000; Howe ve Boothe 2001).

Endotel hücreleri ve trombositlerde bulunan izoenzim eNOS'dur. Damarlarda dilatasyonu sağlayan ve sürekli olarak salıverilen NO'in biyosentezinden sorumludur. Kalsiyum ve kalmoduline bağımlıdır (Tuna ve Çağlayan 1995).

### 2.2.1.2. Nitrik Oksitin Vücuttaki Etkileri

Nitrik oksitin iki temel fonksiyonu vardır. Birinci fonksiyonu düşük konsantrasyonlarda ortaya çıkan ve kısa süren hücre içi ve hücreler arası düzenleyici etkidir. İkinci etkisi ise yüksek konsantrasyonlarda ortaya çıkan ve uzun süren sitotoksik ve sitostatik etkidir. NO'nun hedef olarak etkilediği yapılar; hem moleküllü, Fe-S bileşikleri, tiol grupları ve süperoksit radikalleridir (Moncada ve Higgs 1993; Erel ve ark. 1999). Sentezlenen NO, guanilat siklazı aktive eden bir aracı olarak görev yapar. Moleküler düzeyde NO'in bağlanması ile bu enzim aktive olur ve hücre içinde siklik 3', 5'-guanosin monofosfat (cGMP) seviyesi artar. cGMP, NO'in indüklediği vazodilatasyon, trombosit agregasyonunun inhibisyonu ve lökosit adezyonunun düzenlenmesinden sorumludur (Dweik 2001). Artan hücre içi cGMP, fosfodiesterazlar tarafından 5'-GMP'ye hidrolize edilerek konsantrasyonu azaltılır (Housley 1986).



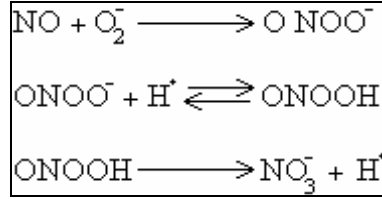
Şekil 2.5. Nitrik oksitin sentezi-inhibisyonu ve etki mekanizması (Özakyol 1998).

Nitrik oksit, kalp kasının kasılım gücünü azaltır. Prostatiklinle sinerjik olarak etki ederek trombosit agregasyonunu ve adezyonunu engeller. Trombositler de NO sentezleyerek, trombosit aktivitesinin kontrolünü sağlarlar. Ayrıca nötrofil kümeleşmesini engelleyici bir etkiye de sahiptirler. Bu özelliği ile de infarktüs alanındaki hasarın sınırlanmasında görev yaparlar (Moncada ve Higgs 1993; Yılmaz ve ark. 2001). NO beyindeki glutamat reseptörünü etkiler ve hücre içi cGMP konsantrasyonunu artırarak fizyolojik etki gösterir. Glutamatın indüklediği sinirsel uyarıda NO bir nörotransmitter olarak rol oynar (Howe ve Boothe 2001). Mide-bağırsak sisteminde ise NO musculus



externa'nın gevşemesine neden olur. Yine bu sistemde mukozal kan akımının düzenlenmesinde, mukozanın korunmasında rol oynamaktadır (Özakyol 1998).

NO'nun diğer etkileri demir-sülfür merkezli enzimlerle etkileşime girerek DNA yapısını bozması veya oksijen radikalleri ile reaksiyona girerek hidroksil radikalleri peroksinitrit gibi zararlı ürünleri oluşturmasıdır (Oral ve Arıboğan 1995; Erbaş 1998).



NO, süperoksit ( $\text{O}_2^-$ ) radikali ile reaksiyona girerek, peroksinitrit ( $\text{OONO}^-$ ) oluşturur. Güçlü bir oksidan olan peroksinitrit, hafif asidik ortamlarda peroksinitröz asidi ( $\text{ONOOH}$ ) oluşturur. Peroksinitröz asit hızla nitrat ve bir oksidan etken olan hidroksil benzeri radikale parçalanır. Peroksinitrit sitotoksiktir ve peroksidasyon yeteneğindedir. NO'nun antimikrobiyel aktivitesi, peroksinitritin kontrol edilen lokal üretiminin sonucudur. Konak dokuların antioksidan düzeyleri NO'nun sitotoksik potansiyelinin anahtarıdır (Howe ve Boothe 2001).

Stich ve ark. (1998) ve Kontaş ve ark. (2006) babesiosisli sığırlarda yaptıkları çalışmada, plazma nitrik oksit düzeyinin akut enfeksiyonda arttığını bildirmişlerdir. Malarya enfeksiyonunda (Gottstein ve Bettens 1994) ve *T. annulata* enfeksiyonunda (Ayerdem ve ark. 2006) nitrik oksit (NO) düzeyinin arttığı belirlenmiştir. Hücrede oluşan reaktif oksijen türleri (ROS), "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinen mekanizmalarla ortadan kaldırılırlar. Ancak bazen hücresel savunma mekanizması vasıtasıyla ortadan kaldırılardan daha fazla reaktif oksijen türleri (ROS) oluşabilir. Organizmada Hücresel savunma mekanizması vasıtasıyla ortadan kaldırılardan daha fazla reaktif oksijen türlerinin (ROS) meydana gelmesi oksidatif stres olarak tanımlanır.

### **2.3. Isı Şok Proteinleri**

Stres proteinleri olarak da isimlendirilen ısı şok proteinler, bütün canlılarda ve hücrelerde bulunan bir grup proteindir. Yüksek sıcaklık, soğuk, oksidasyon ve toksik bileşenlerin parçalanması gibi pek çok stres faktörleri bütün hücrelerde cevap olarak ısı şok proteinlerinin sentezine neden olur (Clark 2000; Moseley 2000).

Moleküler şaperonlar olarak da adlandırılan stres proteinleri, herhangi bir stres uyarınının olmadığı durumlarda sinyal iletimi ve proteinlerin hedef bölgelere ulaştırılmalarından sorumludur. Ancak hücre stres altında olduğunda koruyucu işlevlerine duyulan gereksinim artar. Bütün Hsp'ler geri dönüşümsüz olarak denatüre olmuş proteinlerin temizlenmelerini sağlayarak, makromolekülleri stabilize ederler (Locke 1997).

Stres koşullarında hücrede ATP seviyesi hızla düşer ve proteinlerin korunmasında ilk olarak ATP'den bağımsız olarak rol oynayan Hsp27 ve B-kristallin gibi küçük moleküler ağırlığa sahip şaperonlar proteinlerin korunmasında görev alır. Daha sonra hücre enerji bakımından toparlandığında ATP'ye bağımlı Hsp70 gibi büyük moleküler ağırlığa sahip stres proteinleri devreye girer (Jááttelá 1999).

#### **2.3.1. Isı şok proteinleri çeşitleri**

Isı şok proteinler molekül ağırlıkları, yapıları ve fonksiyonlarına göre 5 sınıfa ayrılırlar. Bunlar Hsp 100, Hsp 90, Hsp 70, Hsp 60 ve küçük ısı şok proteinleridir. Hsp10, Hsp60 ve Hsp75 hücrede mitokondride, diğer Hsp grupları fizyolojik koşullarda sitoplazma ve çekirdekte lokalizedir (Henle 1998).

**Çizelge.1.** Hsp çeşitleri (Jááttelá 1999; Pockley 2001; Kappe 2003)

<b>Hsp Çeşitleri</b>	<b>Hücreyel yerleşim</b>	<b>Görevleri</b>
Hsp100	Nükleus Sitoplazma	Proteinlerin yeniden düzenlenmesi, Mayalarda sıcaklık toleransının kazanılması Prion çoğalması Yeni toplanan proteinleri kurtarma
Hsp 90	Sitoplazma Endoplazmik retikulum	Proteinlere bağlanarak onların aktivasyonunu ve katlanması Geri katlanan peptidlerin kümeleşmesinin önlenmesi Hsf1 (Isı şok faktör-1)'in fizyolojik koşullarda durumunun dengelenmesi
Hsp 70	Sitoplazma Nükleus Endoplazmik retikulum Mitokondri	Stres altında proteinlerin korunması Katlanmamış proteinlerin kümeleşmesinin önlenmesi Katlanmamış ve yanlış katlanmış proteinler arasındaki dengenin sağlanması Polipeptitlerin birbirine bağlanması Hsf'nin aktivitelerinin düzenlenmesi ve ısı şok proteinlerin transkripsiyonunun kontrolü
Hsp 60	Mitokondri Sitoplazma	Hsp 70 ile birlikte proteinin doğal katlanmasına aracılık yapar.
Küçük ısı şok proteinleri		Yapısal olarak bozulmuş proteinlerin ATP'den bağımsız olarak korunması Memeli hücrelerinde, sadece strese karşı korunmada değil, aynı zamanda diğer hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde görev alırlar.

### **2.3.2. Isı Şok Proteinlerinin Artışına Sebep Olan Faktörler**

Yüksek sıcaklık, ağır metal geçişleri, enerji metabolizması inhibitörleri, kemoterapötik ajanlar gibi çevresel faktörler; ateş, yangı, iskemi, hipertrofi, hücre hasar, malignensi gibi hastalık durumları ve normal hücre döngüsü, büyüme faktörü, gelişme ve farklılaşma gibi hücre etkileşimleri ısı şok proteinlerinin artışına neden olur (Anonim 2006).

### **2.3.3. Isı Şok Proteinlerinin Önemi**

Proteinler aşırı ısıya maruz kaldığında; amino-asitlerin bağları kopmaya başlar. Bu proteinler içte karşı karşıya geldiği proteinlere yapışabilir ve kümeler meydana getirebilir. Bu da onları fonksiyon dışı yapabilir. Isı şok proteinleri denatüre proteinleri tutarak toplanmalarını engeller. Özellikle Hsp104 gibi bazı ısı şok proteinleri yeni toplanan proteinleri kurtarma yeteneğine sahiptir (Anonim 2006). Hsp 27' nin pek çok fonksiyonu vardır. Redoks durumundaki hücrelerde glutasyon düzeyini artırır. Hsp 27 nin diğer Hsp' lerden farkı ATP' den bağımsız çalışmasıdır. Ayrıca bağlı proteinlerin agregasyonlarının korunmasında görev alır. Son yıllarda hücreleri apoptosisten koruduğuna dair bulgular vardır (Rogelle 1999).

### **2.3.4. Isı şok proteinleri ve Bağışıklık**

Hücre dışındaki Hsp'ler hastalık veya enfeksiyona karşı bağışıklık sistemini uyarmak için çok güçlü tehlike sinyali gönderirler (Pocley 2001). Pek çok patolojik ajanın konakta immün cevap oluşturmasında rol oynayan antijenlerdir. Stres proteinlerine karşı gelişen immün cevaplar çapraz reaksiyonlar vasıtasıyla hücrenin kendisine karşı da (anti-self) reaksiyon oluşmasına neden olabilmektedir. Sağlıklı bireylerin, enfeksiyon veya herhangi bir şekilde strese maruz kalmış kendi hücrelerinden arınmak için, kendi stres proteinlerine karşı immün cevap verebilme yeteneklerinden yararlanabildikleri ileri sürülmektedir. İşte bu yeteneklerin düzenlenmesindeki bozukluklar bazı otoimmün hastalıklara yol açabilir. Stres proteinleri, immün cevapta hedef olmanın yanı sıra, antijen sunulmasında da önemli rol oynarlar (Laad ve ark. 1999). Hsp 27 ekspresyonu ısı şoku, oksidatif stres, IL-1, TNF alfa, kemoterapik ajanlar ve kadmiyum gibi çeşitli stres faktörlerine cevap olarak

transkripsiyon ve translasyon aşamasında düzenlenir. Hsp 27 redoks durumundaki hücrelerde glutatyon düzeyini artırır (Rogelle 1999).

### **2.3.5. Isı şok proteinlerin Anaplasmosisteki rolü**

Yapılan literatür taramalarında *A.marginale* enfeksiyonunda ısı şok protein düzeyleri hakkında herhangi bir bilgiye rastlanamamasına rağmen malarya, tripanozomiasis, schistosomiasis, theileriosis, babesiosiste hastalık etkeninde Hsp 70 düzeyinin arttığı belirlenmiştir (Mason ve ark. 1989; Carcy ve ark. 1991). Çoğu yangısal hastalıkta görülen yüksek ateş, yangı ve oksidatif strese bağlı hücresel hasar durumlarında ısı şok proteinlerinin ekspresyonu artar (Anonim 2006). Parazitin Hsp düzeyinin artışı konakta parazite karşı bağışıklığı uyarmaktadır (Carcy ve ark. 1991).

### **2.4. Sitokinler**

Sitokinler molekül ağırlığı 8-40.000 Da arasında değişen küçük proteinlerdir. Hücresel kaynaklarını belirtmek için lenfokinler veya monokinler olarak da isimlendirilirler. Endotel hücreleri ve fibroblastlardan köken alırlar. Bu hormon benzeri peptitler ya lokal olarak, ya da kan dolaşımına girerek uzak dokularda etki gösterirler.

Sitokinler birincil olarak enfeksiyon ve hastalıklara karşı konak savunmasında görev alırlar. Kan parazitlerine karşı konak savunmasında önemli olmalarına rağmen dengesiz ve aşırı üretimleri konak için zararlıdır. Şok, doku hasarı, ağırlık kaybı gibi klinik belirtilere sebep olurlar (Dinerello 2000).

İnterlökin (IL) adı ile 18 tane sitokin bulunur. Sitokinlerin bazıları yangının ilerlemesine sebep oldukları için, yangı öncesi sitokinler olarak adlandırılır. Bazıları ise, yangı öncesi sitokinlerin aktivitelerini baskırlar, bunlara da anti-inflamatuvar sitokinler denilir. Örneğin, IL-4, IL-10 ve IL-13 B-lenfositlerin esas aktivatörleridir ve anti-inflamatuvar sitokinlerdir. IL-1, TNF ve kemokinler gibi yangı öncesi sitokinleri kodlayan genleri baskılama yeteneğine sahiptirler. İnterferon-gama (IFN- $\gamma$ ) ise antiviral aktiviteye sahip bir sitokindir. Yangı öncesi sitokin olduğuna inanılır, çünkü TNF aktivitesini arttırıp, nitrik oksit sentezini uyarır (Dinerello 2000).

**Çizelge.2.** Interlökin çeşitleri ve fonksiyonları (Jááttelá 1999; Pockley 2001; Kappe 2003)

<b>İnterlökinler</b>	<b>Ana Kaynağı</b>	<b>Birincil Görevleri</b>
IL-1 $\alpha$ ve $\beta$	Makrofajlar ve Monositler	İnflamasyon, Akut faz cevabı, Hematopoiezis
IL-2	Aktive olmuş TH1 hücreler Natural Killer (NK) hücreleri	B ve T hücrelerinin proliferasyonu NK fonksiyonları
IL-3	Aktive olmuş T hücreleri	Hematopoietik progenitor hücrelerin büyümesi
IL-4	TH2 ve mast hücreleri	B hücre proliferasyonu, Mast hücresi ve eozinofillerin büyümesi ve fonksiyonu, Monokin üretiminin inhibisyonu
IL-5	TH2 ve mast hücreleri	Eozinofillerin büyümesi ve fonksiyonu
IL-6	Aktive olmuş TH2 hücreleri	Akut Faz Cevabı, B Hücre Proliferasyonu, Trombopoiezis, IL-1 ve TNF-alfa ile T lenfositler üzerine sinerjik etki
IL-8	Makrofajlar ve diğer somatik hücreler	Nötrofiller ve T lenfositler için kemoatraktan etki
IL-9	T lenfositler	Hematopoietik etki
IL-10	Aktive olmuş TH2 hücreleri, CD8+ T ve B lenfositler, Makrofajlar	Sitokin üretimini inhibe etmek, B hücrelerinin proliferasyonuna ve antikor üretimine yardımcı olmak
IL-11	Stromal hücreler	Hematopoietik ve trombopoietik etki
IL-12	B lenfositler ve makrofajlar	IFN- $\gamma$ üretimi, NK hücrelerinin proliferasyonu, Hücrel immun cevabın geliştirilmesi
IL-13	TH2 hücreleri	IL-4 gibi etki eder

### 2.4.1. Interlökin 6 (IL-6)

IL-6 molekül ağırlığı 20 ila 29 kDa arasında değişen, 4 alfa helikal uzun-zincire sahip olan pleiotropik bir sitokindir (Burtis ve Ashwood 1999). T ve B lenfositler, monosit/makrofajlar, fibroblastlar, endotel hücreleri, epitel hücreleri, mast hücreleri, nöron hücreleri, astrositler, osteoblastlar, epidermal langerhans hücreleri, dentritik hücreler ve keratinositleri içine alan çok yaygın bir hücre grubu tarafından sentez edilirler (Naka ve ark. 2002; Kishimoto ve ark. 1995).

IL-6, çok değişik biyolojik etkileri olan bir immun sistem medyatörüdür. Bakteriye toksinler ve bakteri orjinli metalloproteinazlar IL-6'nın aktive olmuş nötrofil ve monositlerden salınımını uyarırlar. IL-6 konak savunmasında pekçok fonksiyona aracılık eder. T lenfositleri aktive ederken, B lenfositleri için de bir farklılaşma faktörü olarak rol oynar. Kazanılmış immünitede B hücrelerinden antikor üretimini uyarır. IL-2 varlığında T hücrelerinin sitotoksik T hücrelerine farklılaşmasını ve timositlerin proliferasyonunu uyarır. Ayrıca aktive olmuş makrofajların ve lenfositlerin etkilerini düzenler (Ohno ve ark. 1993; Rader 2000). IL-6 akut faz cevabı için merkezi bir uyarandır, hepatositlerde akut faz cevabın artmasında rol oynar. Bu etkisini C-reaktif protein (CRP), haptoglobin, fibrinojen ve proteaz inhibitörleri gibi akut faz proteinlerinin üretimini arttırarak gerçekleştirir. IL-6, CRP'nin karaciğerde üretiminde primer belirleyicidir (Daftarian ve ark. 1996; Rader 2000).

IL-6 endotel hücrelerinde IL-1 ve TNF- $\alpha$ 'ın sekresyonunu arttırırken, IL-1 ve TNF- $\alpha$  ise IL-6 sekresyonunu arttırmaktadır. Ayrıca IL-6 T lenfositlerinde IL-10 üretimi uyarır. IL-10 ise posttranskripsiyonel mekanizma ile IL-6'nın sentez ve sekresyonunu baskılar (Daftarian ve ark. 1996). Bu nedenle IL-6 doğal ve kazanılmış immünitede rol oynamaktadır (Burtis ve Ashwood 1999).

Artmış serum IL-6 düzeyleri sepsis, otoimmün hastalıklar, lenfomalar, enfeksiyon ve transplant reddi gibi durumlarda gözlenir (Ohno ve ark. 1993; Rader 2000). Ayrıca birçok hücre tipi için otokrin bir büyüme faktörü olduğundan dolayı bunun yüksek üretimi; multiple miyeloma, uterus- serviks kanserleri gibi bir çok malignensi ile birliktelik göstermektedir (Ikeda ve ark. 2002). Adezyon moleküllerinin uyarılması ve yangıya bağlı hasarda olası rolü olması nedeni ile aterogenez ve vasküler inflamasyonun gelişiminde

ilişkisi olabileceği düşünülmektedir (Ohno ve ark. 1993; Rader2000). IL-6 düzeyinin lipid peroksidasyonu ve yangı ile pozitif ilişkili olduğu bildirilmiştir (Morohoshi ve ark. 1995).

**Çizelge.3.** IL- 6'nın hücresel kaynakları ve etkilediği hücreler (Burtis ve Ashwood, 1999)

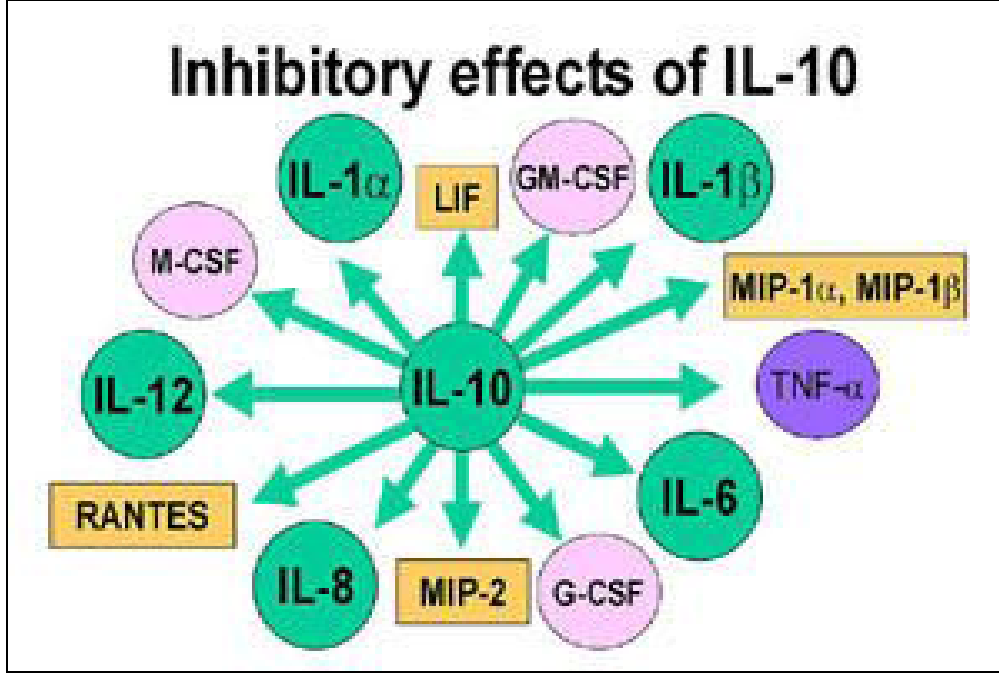
Hücresel kaynak	Etkilediği hücre
<ul style="list-style-type: none"><li>• T lenfositler</li><li>• B lenfositler</li><li>• Monositler</li><li>• APC ler</li><li>• Endotel hücreler</li><li>• Epitelyal hücreler</li><li>• Fibroblastlar</li><li>• Mast hücreleri</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• T lenfositler</li><li>• B lenfositler</li><li>• Hepatositler</li><li>• Endotelyal hücreler</li><li>• Kreatinositler</li><li>• Hematopoitik hücreler</li><li>• Plazma hücreleri</li></ul>

#### 2.4.2. Interlökin-10 (IL-10)

IL-10, 34-40 kDa ağırlığında 160 aminoasitten oluşan protein yapısında bir moleküldür ve 18 kDa ağırlığındaki 4 alt ünitelerden meydana gelir. Üç boyutlu yapısı halen bilinmemektedir (Burtis ve Ashwood 1999). IL-10'nun sentezinden sorumlu olan IL-10 geni, 1. kromozom (1q31-32) üzerinde bulunur ve 4.89 kb uzunluğundadır. 5 ekzondan oluşur. IL-10 T ve B lenfositler, makrofajlar, keratinositler gibi birçok hücre tarafından üretilir (Callard ve Gearing 1994).

IL-10'un üretimi T lenfositlerde IL-12 ve IL-6 tarafından, monositlerde ise TNF- $\alpha$  tarafından artırılır. Lipopolisakkaritler (LPS) tarafından uyarılan monositlerde yangı öncesi sitokin olan TNF- $\alpha$ 'nın üretimi ile anti-inflamatuar etkiye sahip olan IL-10 salınımı da gerçekleşir. IL-10, Tip II sitokin reseptörüne bağlanmaktadır. Makrofajların IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 ve TNF- $\alpha$  salgılamasını ve T lenfositlerin IFN- $\alpha$  salgılamasını baskılar. Bunu TNF- $\alpha$ , IL-1 ve IL-6 gibi sitokinlerin sentezini transkripsiyonel (TNF- $\alpha$  ve IL-1) ve posttranskripsiyonel (IL-1 ve IL-6) düzeyde baskılayarak gerçekleştirir (Baumann ve ark. 1996; Jeannin ve ark. 1998).





Şekil 2.6. IL-10'un inhibe ettiği moleküller

IL-10, Th2 lenfositleri tarafından üretilen sitokinleri inhibe etmesinden dolayı, alerjik reaksiyonların şiddetinin azalmasına neden olur (Burtis ve Ashwood 1999). Birçok çalışmada kortikosteroid tedavinin IL-10 düzeylerini artırarak alerjik reaksiyonu baskıladığı saptanmıştır. İn-vitro olarak IL-4 ve IL-10 varlığında IgE düzeyinin azaldığı saptanmıştır (Jeannin ve ark. 1998).

Pleiotropik bir etkiye sahip olan IL-10 bazı özel immün reaksiyonların kontrolünde ve hücre aracılı immün cevabın engellenmesinde rol oynamaktadır. IL-10 genel yangı öncesi sitokinleri ve akut faz cevabını inhibe ederken, B hücrelerinin plazmositlere dönüşümüne neden olmaktadır (Male ve ark. 1996). Ayrıca makrofajlarda NOS' un uyarılmasını da azaltır. IL-10, IL-4 ve IL-13 ile birlikte fibrinojen biyosentezini baskılayarak koruyucu bir vasküler etki sağlar. IL-2 ve IL-3 bağımlı T lenfosit proliferasyonunu artırarak, lokal birikimini sağlar (Mallat ve ark. 1999).

**Çizelge 4.** IL-10'nun hücresel kaynakları ve etkilediği hücreler (Burtis ve Ashwood, 1999)

<b>Hücresel kaynak</b>	<b>Hedef hücre</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• T lenfositler</li><li>• B lenfositler</li><li>• Makrofajlar</li><li>• Kreatositler</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• T lenfositler</li><li>• B lenfositler</li><li>• NK hücreler</li><li>• Monositler</li><li>• Mast hücreleri</li></ul>

#### **2.4.2.1. IL-10'nun Etki Mekanizması**

IL-10 molekülü reseptörü olan IL-10R reseptörüne bağlanarak aktivitesini gösterir. IL-10R reseptörü JAK/STAT reseptör ailesine aittir. Fakat IL-10 tek başına bu anti-inflamatuar etkisini gösteremez. Bu etkisini gösterebilmesi için öncelikle MAPK yolunu kullanarak heme oxygenase (HO-1) enzimini üreten geni aktive etmesi gerekir. Bunun için IL-10 reseptörüne bağlandıktan sonra JAK/STAT molekülleri yardımıyla MAPK yoluna girer ve sonra da P38 kinazlar yardımıyla HO-1 geninin transkripsiyonunu gerçekleştirir. Bu gen de HO-1 enzimini üreterek heme molekülünün biliverdine dönüşümünü katalizler. Daha sonra biliverdin redüktaz enziminin katalizörlüğünde bilirubine dönüştürülür. Böylece anti-inflamatuar cevap oluşur (Barrett 1996).

**Şekil.2.7. IL-10'nun etki mekanizması (Barrett 1996)**

**2.5.Amaç**

Bu çalışmada anaplasmosisli sığırlarda oksidatif stres ve immun sistem değişimlerinin ısı şok protein (Hsp-27), nitrik oksit (NO), interlökin- 6 (IL- 6) ve interlökin-10 (IL-10) parametreleri ile ortaya konulması amaçlanmıştır. Anaplasmosiste oksidatif stres ve immun sistem değişimlerine yönelik sınırlı sayıda çalışma vardır. Ayrıca ısı şok protein düzeyleri anaplasmosiste ilk kez belirlenecektir. Böylece bu çalışmadan elde edilecek sonuçlar ile ülkemizde önemli ekonomik kayıplara sebep olan bu hastalığın prognozu açısından yeni bilgiler ortaya konulacaktır.

### **3. GEREÇ ve YÖNTEM**

#### **3.1. Gereç**

Bu çalışma için gerekli kan örnekleri, 2006-2007 yıllarına ait yaz dönemlerinde MKÜ Veteriner Fakültesi Kliniğine gelen 1-3 yaş arasında 15 sağlıklı ve 15 anaplasmosisli sığırlardan sağlanmıştır. Kontrol ve hasta gruplarının belirlenmesi, hastalığın klinik belirtileri ve giemsa boyalı perifer kan frotileri yardımıyla yapılmıştır.

Sığırların Vena jugularisinden tekniğine uygun olarak heparinli tüplere ve serum tüplerine 10 ml kan alınmış, serum ve plazmaları çıkarılarak MDA analizleri yapıldıktan sonra, diğer analizler için -20 °C'de saklanmıştır. Hayvanların kuyruk uçlarından alınan kanlardan frotiler hazırlanmış ve Giemsa ile boyanmıştır. Frotilerde piroplasmik formlar araştırılmıştır.

Araştırmada MDA ve NO düzeylerinin belirlenmesinde spektrofotometrik yöntemler kullanıldı. Hsp-27, IL-6 ve IL-10 düzeylerinin belirlenmesinde ise ticari ELISA kitleri kullanıldı.

#### **3.2. Protozoolojik ve Biyokimyasal analizler**

##### **3.2.1. Kan frotilerinin hazırlanması ve boyanması**

Sığırların kuyruk uçlarından hazırlanan sürme kan frotileri laboratuara getirildikten sonra alkol ile 5 dk. tespit edildi ve kurutuldu. Bu işlemi takiben %5 Giemsa solusyonu (pH: 7,2) ile 45 dk. boyandı. Preparatlar kurutulduktan sonra x100 büyütmede bakılarak etken teşhisi yapıldı.

##### **3.2.2. Malondialdehit (MDA) Analizi**

Kan plazma örneklerinde MDA tayini Yoshiko ve ark. (1979) tarafından modifiye edilen yöntemle spektrofotometrik olarak yapıldı. Bu yöntem lipid peroksidasyonunun aldehit ürünlerinden biri olan MDA ile tiyobarbitirik asidin (TBA, Merck) reaksiyonu temeline dayanmaktadır. MDA, TBA ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve bu çözeltinin absorbanasının 535 nm'de spektrofotometrik ölçümü (UV mini-1240 Shimadzu)

ile lipid peroksidasyonunun derecesi saptanmaktadır. Elde edilen sonuçlar  $\mu\text{mol/L}$  cinsinden verildi.

### **3.2.3. Nitrik oksit (NO) Düzeylerinin Belirlenmesi**

Hücre kültürleri medium NO ölçümünde bu molekülün yarı ömrünün çok kısa olması nedeni ile NO düzeyi göstergesi olan nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) ve nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) düzeylerinin saptanmasıyla hesaplanmaktadır. Bu amaçla Griess metodu (Cortas ve Wakid 1990) kullanıldı. Total NO miktarı, aktifleştirilmiş kadmiyum granüllerinin nitratı nitrite dönüştürmesinden sonra spektrofotometrede 545 nm dalga boyunda ölçülerek bulundu. Elde edilen veriler  $\mu\text{mol/L}$  cinsinden verildi.

### **3.2.4. Plazma HSP-27 Düzeyinin Belirlenmesi**

Plazma Hsp-27 düzeyi ticari kit (Catalog No: KH00331, Biosource, USA) kullanılarak ELISA (Enzim bağlı immün assay) yöntemi ile belirlendi. ELISA pleytinde Hsp-27'ye spesifik poliklonal antikorlarla kaplı kuyucuklara konsantrasyonu bilinen HSP-27 standartları ve plazma örnekleri konuldu. Birinci inkübasyon süresince Hsp-27 antijenleri ve Hsp-27'ye spesifik tavşan poliklonal antikorlar eş zamanlı olarak inkübe edilip ilk yıkamadan sonra anti-rabbit IgG-HRP enzimi eklendi. Bağlanmayan enzim ikinci inkübasyon ve yıkamadan sonra ayrıştırıldı. Daha sonra, substrat solusyonu renk reaksiyonu oluşturmak için eklendi. Hsp-27 bulunan örneklerde yoğunluğa bağlı olarak renk değişimi gözlemlendi. Örnekler ELISA okuyucusunda ( $\mu\text{Quant-Bio-Tek Instruments}$ ) 450 nm dalga boyunda okundu, standart yardımıyla hesaplama yapıp sonuçlar ng/ml cinsinden verildi.

### **3.2.5 Serum IL-6 Düzeyinin Belirlenmesi**

Serum İnterlökin-6 (IL-6) düzeyi DRG IL-6 Enzim Immunoassay Test Kiti (Catalog No:0979, Almanya) ile ölçüldü. ELISA pletlerinde insan IL-6'ya spesifik poliklonal antikorlarla kaplı kuyucuklara konsantrasyonu bilinen IL-6 standartları ve plazma örnekleri konuldu. Birinci inkübasyondan sonra, pleyt yıkanarak, poliklonal IL-6 antikoru (biotin konjugat) eklendi. İkinci inkübasyondan sonra bağlanmayan biyotin konjugatlar yıkama ile uzaklaştırıldı. Yıkamadan sonra enzim ile işaretli goat-antirabbit-

IgG (Streptavidin-HRP) eklendi. Bağlanmayan enzim de inkübasyon ve yıkamadan sonra ayrıştırıldı. Daha sonra, substrat solusyonu renk reaksiyonu oluşturmak için eklendi. IL-6 bulunan örneklerde yoğunluğa bağlı olarak renk değişimi gözlemlendi. Örnekler ELISA okuyucusunda ( $\mu$ Quant-Bio-Tek Instruments) 450 nm dalga boyunda okundu, standart yardımıyla hesaplama yapıp sonuçlar pg/ml cinsinden verildi.

### 3.2.6 Serum IL-10 Düzeyinin Belirlenmesi

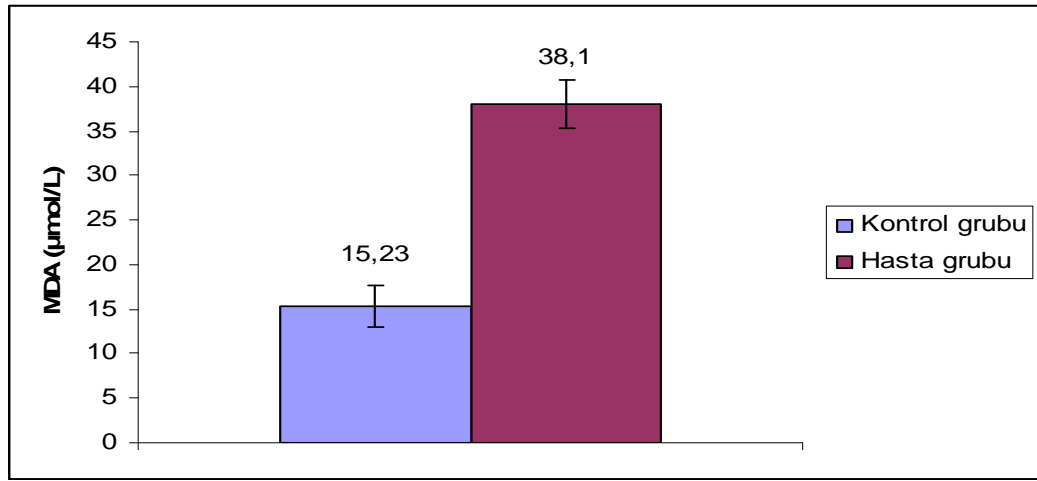
Serum İnterlökin-10 (IL-10) düzeyi domuz DRG IL-10 Enzim Immunoassay Test Kiti (Catalog No:3184, Almanya) ile ölçüldü. ELISA pleytlerinde IL-10'a spesifik poliklonal antikorlarla kaplı kuyucuklara konsantrasyonu bilinen IL-10 standartları ve serum örnekleri konuldu. Birinci inkübasyondan sonra, pleyt yıkanarak, biyotin konjugat eklendi. İkinci inkübasyondan sonra bağlanmayan biyotin konjugatlar yıkama ile uzaklaştırıldı. Yıkamadan sonra streptavidin- HRP enzimi eklendi. Bağlanmayan enzim de inkübasyon ve yıkamadan sonra ayrıştırıldı. Daha sonra, substrat solusyonu renk reaksiyonu oluşturmak için eklendi. IL-10 bulunan örneklerde yoğunluğa bağlı olarak renk değişimi gözlemlendi. Örnekler ELISA okuyucusunda ( $\mu$ Quant-Bio-Tek Instruments) 450 nm dalga boyunda okundu, standart yardımıyla hesaplama yapıp sonuçlar pg/ml cinsinden verildi.

### 3.2.7. İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde 'SPSS 11.0 for windows' paket programı kullanıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel farklar *student t test* kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar  $X \pm S.E.$  olarak verildi.  $p < 0.05$  ve altı istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

## 4. BULGULAR

Anaplasmosisli sığırların akut enfeksiyonunda (hasta grubu) ve kontrol grubunda MDA, NO, HSP-27, IL-6 ve IL-10 düzeyleri Çizelge 5 'te verilmiştir. Buna göre anaplasmosisli sığırlarda ve kontrol grubunda MDA kan plazma düzeyi, kontrol grubu sığırlarda ortalama 15.23  $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçülürken, anaplasmosisli sığırlarda 38.10  $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçülmüştür. Anaplasmosisli sığırların plazma MDA düzeyi, kontrol grubundaki sığırlardan istatistik olarak  $p \leq 0.001$  önem düzeyinde yüksek bulunmuştur (Çizelge 5, Şekil 4.1).



**Şekil 4.1.** Anaplasmosisli sığırlarda (Hasta grubu) ve kontrol grubu plazma MDA düzeyleri

Anaplasmosisli sığırların NO düzeyi kontrol grubu sığırlarda ortalama 21.21  $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçülürken, anaplasmosisli sığırlarda 42.56  $\mu\text{mol/L}$  olarak ölçülmüştür. Anaplasmosisli sığırların plazma NO düzeyi, kontrol grubundaki sığırlardan istatistik olarak  $p \leq 0.001$  önem düzeyinde yüksek bulunmuştur (Çizelge 5, Şekil 4.2).

**Şekil 4.2.** Anaplasmosisli sığırlarda ( Hasta grubu) ve kontrol grubu plazma NO düzeyleri

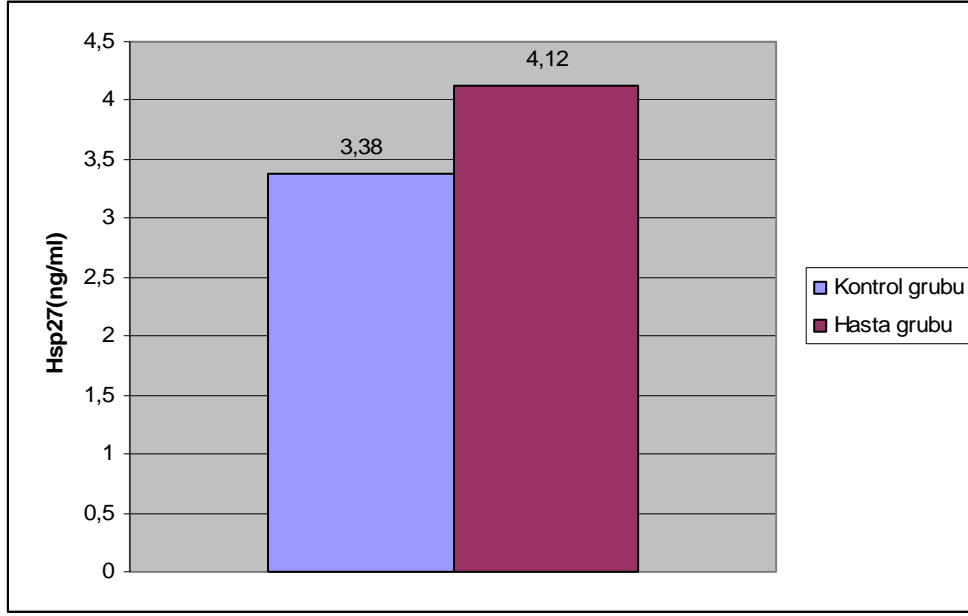
**Çizelge 5.** Kontrol grubu ve hasta grubu (Anaplasmosisli sığırlar)'nın MDA, NO, HSP-27, IL-6 ve IL-10 düzeyleri

Testler	Kontrol grubu n=15	Hasta grubu n=15
MDA (µmol/L)	15.23 ± 2.33	38,10 ± 2,71*
NO (pg/ml)	21.21 ± 3.52	42,56 ± 4.19*
HSP-27 (ng/ml)	3.38 ± 0.35	4.12 ± 0.17†
IL-6 (pg/ml)	18.42 ± 2.11	31.49 ± 5.88*
IL-10 (pg/ml)	12.25 ± 1.13	10.71 ± 1.19

Kontrol grubu ile hasta grubu arasında \* p<0.001, † p<0.01 ve ‡ p<0.05 derecesinde önemlilik olduğunu göstermektedir.

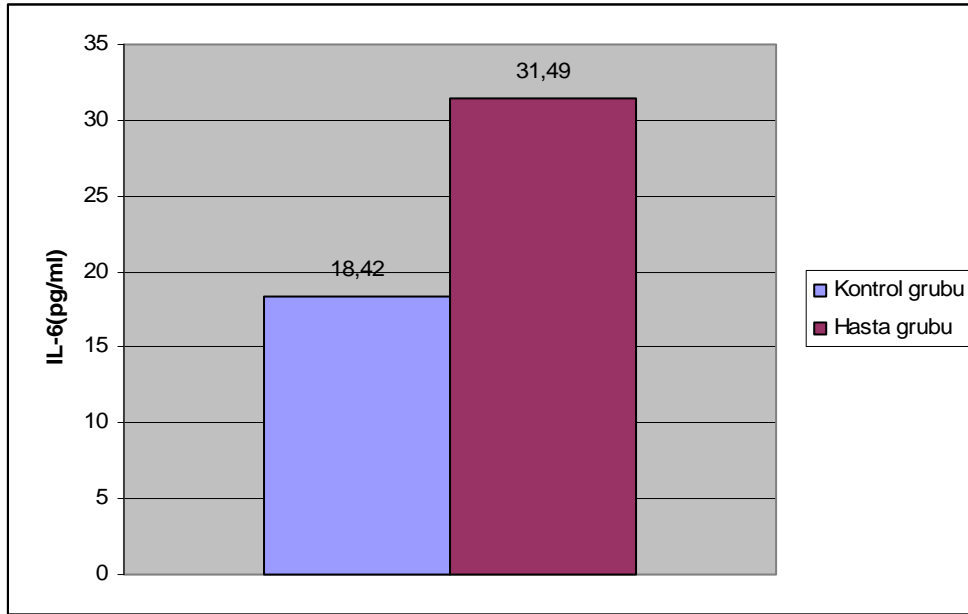
Kan plazma Hsp-27 düzeyi, kontrol grubu sığırlarda ortalama 3.38 ng/ml olarak ölçülürken, anaplasmosisli sığırlarda 4.12 ng/ml olarak ölçülmüştür. Sığırların kan plazma Hsp-27 düzeyi anaplasmosisli sığırlarda kontrol grubundan, istatistiksel olarak p≤0.01 önem düzeyinde yüksek bulunmuştur (Çizelge 5, Şekil 4.3).





**Şekil 4.3.** Anaplasmosisli sığırlarda ( Hasta grubu) ve kontrol grubu plazma HSP- 27 düzeyleri

Serum IL-6 aktivitesi ise, kontrol grubu sığırlarda ortalama 18.42 pg/ml olarak ölçülürken, anaplasmosisli sığırlarda 31.49 pg/ml olarak ölçülmüştür. Anaplasmosis’li sığırların serum IL-6 aktivitesi, kontrol grubundaki sığırlardan istatistik olarak  $p \leq 0.001$  önem düzeyinde yüksek bulunmuştur (Çizelge 5, Şekil 4.4 ).



**Şekil 4.4.** Anaplasmosisli sığırlarda (Hasta grubu) ve kontrol grubu serum IL-6 düzeyleri

Serum IL-10 aktivitesi ise, kontrol grubu sığırlarda 12.25 pg/ml olarak ölçülürken, hasta grubunda ise 10.71 olarak ölçülmüştür. Kontrol grubu ve anaplasmosisli sığırların IL-10 düzeyleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunamamıştır.

## 5. TARTIŞMA

Kan parazit hastalıkları sığırlarda sıklıkla görülmekte olup, Türkiye’de de oldukça yaygındır (Keleş 2001). Bu hastalıklardan tropikal theileriosis en yaygın görülen kan paraziti hastalığıdır. Babesiosis ve anaplasmosis ise diğer önemli kan paraziti hastalıklarındandır. Anaplasmosis Türkiye’ de her bölgede görülmektedir (Birdane ve ark. 2006).

Organizmada akut faz cevabı ve yangı sırasında reaktif oksijen ürünlerinin oluşumu artar. Buna bağlı olarak lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres meydana gelir (Arslan ve ark. 2008). Lipid peroksidasyonu, oluşan serbest radikallerin ve son ürünler olan aldehitlerin sitotoksik etkileri sonucu farklı yollarla hücre hasarına neden olmaktadır. Bununla birlikte, son ürünlerden olan aldehit yapılı bileşiklerin uzun süreli etki gösterebilmesi ve zararlı geçebilmesi nedeniyle, lipid peroksidasyonunun hedef organlardaki etkilerinden sorumludur (Yagi 1987). Malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyonunun parçalanması sonucu oluşan aldehit yapılı bileşiklerden birisidir (Slater 1984; Yagi 1987).

Literatür taramalarında anaplasmosiste MDA düzeyleri ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Kan paraziti hastalıklarından olan tropical theileriosisde (May ve ark. 1998; Grewall ve ark. 2005), malaryada (Das ve ark. 1990) MDA düzeyinin arttığı belirlenmiştir. Bu çalışmada anaplasmosisli sığırlarda MDA düzeyleri kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Anaplasmosisli sığırlarda görülen bu artışın sebebi, parazitemiye bağlı olarak görülen eritrosit parçalanması ve anemi oluşması sonucu, lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres hasarının meydana gelmesi olabilir. Yani artan MDA konsantrasyonu, anaplasmosisli sığırlarda oksidatif stresin belirtisi olabilir.

Stres proteinleri olarak da isimlendirilen ısı şok proteinler, bütün canlılarda ve hücrelerde bulunan bir grup proteindir. Çeşitli stres faktörleri altında, hücrede bu proteinlerin sentezi artar (Moseley 2000). Kan paraziti hastalıkları gibi çoğu yangısal hastalıkta görülen yüksek ateş, yangı ve hücresel hasar durumları stres proteinlerinin ekspresyonuna sebep olur (Anonim 2006). Yapılan literatür taramalarında *A.marginale* enfeksiyonunda ısı şok protein düzeyleri hakkında herhangi bir bilgiye rastlanamamasına

rağmen malarya, tripanozomiasis, schistosomiasis, theileriosis, babesiosiste hastalık etkeninde Hsp 70 düzeyinin arttığı belirlenmiştir (Mason ve ark. 1989; Carcy ve ark. 1991). Zhang ve ark. (1999), Plasmodium yoelii etkeninde Hsp 65 düzeyinin enfeksiyon sırasında arttığını bildirmişlerdir. Fakruddin ve ark. (2000), *Plasmodium vivax* ile enfekte insanlarda yaptıkları çalışmada Hsp düzeyinin arttığını bildirmişlerdir

Anaplasmosis ile enfekte sığırlarda Hsp 27 düzeyleri belirlenmemiş olmasına rağmen, vasküler hastalıklar, hipertermi, apoptozis ve çeşitli kanser hastalıklarında Hsp 27 üretiminin arttığı belirlenmiştir (Ciocca ve ark. 1993). Oksidatif stres esnasında Hsp 27'nin hücre içi ekspresyonu artar ve fosforile olur. Artan Hsp 27 ekspresyonu hücre içi demir içeriğini düşürür ve buna bağlı olarak hidroksil radikallerinin ve okside proteinlerin oluşumunu azaltır. Böylece TNF- $\alpha$  aracılı lipid peroksidasyonu ve ROS miktarındaki artışa bağlı olarak gelişen çeşitli negatif etkiler (ateş, yangı vs.) küçük Hsp'ler tarafından inhibe edilir. Ayrıca Hsp 27 hücre içi glutasyon seviyesini de artırır (Ferns ve ark 2006).

Bu çalışmada kan plazma Hsp 27 düzeyi, kontrol grubu sığırlarda ortalama 3.38ng/ml olarak ölçülürken, anaplasmosisli sığırlarda 4.12 ng/ml olarak ölçülmüştür. Sığırların kan plazma Hsp 27 düzeyi anaplasmosisli sığırlarda kontrol grubundan, istatistiksel olarak  $p \leq 0.01$  önem düzeyinde yüksek bulunmuştur (Çizelge 5, Şekil 4.2). Çalışmada Hsp 27 seviyesinin hasta grubunda artmasının sebebi, konak immun sisteminin parazit Hsp'leri tarafından uyarılması ile TNF- $\alpha$  salınımının artması ve buna bağlı olarak meydana gelen yüksek ateş, yangı gibi stres faktörlerinin Hsp 27 ekspresyonunu artırması olabilir. Ayrıca hücre içinde seviyesi artan Hsp 27 yangı sırasında oluşan ROS'lara karşı antioksidan gibi görev yapar. Bunu hücre içi glutasyon seviyesini artırıp demir miktarını azaltarak yerine getirir (Carcy ve ark. 1991).

Anaplasmosise karşı bağışıklığın meydana gelmesinde spesifik ve spesifik olmayan mekanizmalar rol oynar. Spesifik olmayan immunitede aktif monositler ve makrofajlar ile bunların ürünleri olan sitokinler rol oynar (Goff ve ark. 2002). Proinflamatuvar bir sitokin olan tümör nekrozis faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) parazitlere karşı immun cevabın oluşmasında ve düzenlenmesinde kritik rol oynar. Shoda ve ark. (2000) ve Goff ve ark. (2002), TNF- $\alpha$ 'nın makrofajları aktive ederek, NO ve reaktif oksijen türleri ROS salınımını uyardığını göstermiştir. Stich ve ark. (1998) ve Goff ve ark. (2002) babeosisli

sığırlarda yaptıkları çalışmalarda, Gottstein ve Bettens (1994) malaryada, Ayerdem ve ark. (2006) ise *T. annulata* enfeksiyonunda nitrik oksit (NO) düzeyinin arttığı belirlemiştir.

NO aktif makrofajlar tarafından üretilen ve patojen organizmaların kontrolünde rol oynayan bir moleküldür. Anti-paraziter etki meydana getirdiği ortaya konmuştur (Ayerdem ve ark. 2006).

Bu çalışmada anaplasmosisli sığırların NO düzeyi kontrol grubu sığırlarda ortalama 21.21 µmol/L olarak ölçülürken, anaplasmosisli sığırlarda 42.56 µmol/L olarak ölçülmüştür. Anaplasmosisli sığırların plazma NO düzeyi, kontrol grubundaki sığırlardan istatistik olarak  $p \leq 0.001$  önem düzeyinde yüksek bulunmuştur (Çizelge 5, Şekil 4.2). Anaplasmosis'li sığırlarda kan serumu NO seviyelerindeki bu yükselme, anaplasma etkenlerinin sığır makrofajlarında NO üretimini uyarmaları ve salınımını arttırmalarından kaynaklanabilir.

TNF- $\alpha$  ve NO ile birlikte, yangısal sitokinler de paraziter hastalıklara karşı bağışıklıkta ve hastalığın patogenezinde önemli rol oynarlar. Parazitler veya diğer enfeksiyon ajanlarına bağlı olarak doku hasarının meydana gelmesi sonucu non-spesifik bir savunma reaksiyonu olan akut faz cevabı uyarılır. Akut faz cevabı, doku hasarının olduğu bölgede aktive edilmiş lökositlerden salınan interlökin 1 (IL-1), interlökin 6 (IL-6) ve TNF- $\alpha$  gibi proinflamator sitokinler tarafından stimüle edilir. Bu sitokinler enfeksiyöz hastalıklara ve yangıya karşı primer yanıtı yönetir ve sistemik reaksiyonları başlatır. Karaciğerde bu sitokinler akut faz proteini (AFP) olarak bilinen glikoproteinlerin üretimini ve plazma salınımını uyarırlar (Ulutaş ve ark. 2008). IL-6 yangı öncesi sitokindir ve akut faz yanıtının esas uyarandır. Hepatositlerde akut faz cevabın artmasında rol oynar. Bu etkisini C-reaktif protein (CRP), haptoglobin, fibrinojen ve proteaz inhibitörleri gibi akut faz proteinlerinin üretimini arttırarak gerçekleştirir. Diğer yangı öncesi sitokinlerle (TNF- $\alpha$  ve IL-1) birlikte IL-6 seviyesinin artması akut enfeksiyonda klinik belirtilerin ortaya çıkmasına neden olur. Bu da eritrositlerin parçalanmasını arttırır ve fagositosizi uyarır. Ve sonucunda anemi meydana gelir. Ayrıca enfeksiyon sırasında görülen yüksek ateşten de IL-6 sorumludur. Akut faz cevabına neden olan sitokinler karaciğer albumin sentezi üzerinde baskılayıcı etki gösterirler. Grab ve ark. (2007), *Anaplasma phagocytophilum* ile

Lyke ve arkadaşları (2004), malarya enfeksiyonu ile ilgili yaptıkları çalışmada IL-6 düzeyinin arttığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada IL-6 düzeyinin yüksek bulunmasının nedeni, anaplasma etkeni tarafından makrofajların uyarılması sonucu konak savunma sisteminde ve hastalığın patogenezinde önemli rolü olan yangı öncesi sitokinlerin (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) sentezi ve salınımı artması olabilir.

Lipopolisakkaritler (LPS) tarafından uyarılan monosit ve makrofajlarda yangı öncesi sitokinler olan TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-12 'nin üretimi ile anti-inflamatuar etkiye sahip olan IL-10 sentezini artırır. IL-10 hücre aracılı immün cevabın engellenmesinde rol oynamaktadır. Yangı öncesi sitokinleri ve akut faz cevabını inhibe ederken, B hücrelerinin plazmositlere dönüşümüne neden olur (Male ve ark. 1996). Ayrıca makrofajlarda iNOS'un uyarılmasını da azaltır. Brown ve ark. (1996), *Babesia bovis* ile enfeksiyonunda; Lyke ve arkadaşları (2004), malarya enfeksiyonunda; Abbott ve ark. (2005) ise anaplasmosiste IL-10 düzeyinin arttığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada serum IL-10 aktivitesi ise, kontrol grubu sığırlarda 12.25 pg/ml olarak ölçülürken, hasta grubunda ise 10.71 olarak ölçülmüştür. Kontrol grubu ve anaplasmosisli sığırların IL-10 düzeyleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunamamıştır. Doğal kazanılmış bağışıklıkta rol oynayan IL-6 sentezi TNF $\alpha$  tarafından arttırılmaktadır. IL-6 da T lenfositlerinde IL-10 üretimi uyarır (Daftarian ve ark. 1996). IL-10 seviyesinin kontrol ve hasta grubunda değişmemesi ve IL-6 düzeyinin hasta grubunda artış göstermesi, hastalığın gelişme evresinin başında olduğunu gösterebilir. Enfeksiyon sırasında IL-10 seviyesinin yükselmemesi enfeksiyonun gelişme evresinin başında olduğunu henüz IL-6' nın IL-10 sentezini uyarmadığı düşünülmektedir.

## 6.SONUÇ

Anaplasmosis tropik ve subtropik bölgelerde yaygın olarak görülen ve kenelerle nakledilen protozoer bir hastalıktır. Özellikle kenelerin aktif olduğu Mayıs-Eylül ayları arasında görülmektedir. Tedaviye cevap veren hayvanlarda et-süt veriminin düşmesi, tedavide kullanılan ilaçların pahalı olması nedeniyle hayvancılık sektöründe önemli yere sahiptir.

Çalışmada anaplasmosisli hayvanlarda MDA, Hsp, NO ve IL-6 düzeyleri, kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. IL-10 düzeyinde önemli bir farka rastlanmamıştır. Anaplasmosisli sığırlarda MDA ve Hsp düzeylerindeki artışın sebebi, sığırlarda parazitemiye bağlı olarak, eritrositlerin parçalanması sonucu lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres hasarının meydana gelmesi olabilir. Yani artan MDA konsantrasyonu, anaplasmosisli sığırlarda oksidatif stresin belirtisidir. Hsp artışı, oksidatif strese karşılık antioksidan savunmanın devreye girmesinin belirtisidir. IL-6'nın artışı anaplasma etkeni tarafından makrofajların uyarılması sonucu konak savunma sisteminde ve hastalığın patogenezinde önemli rolü olan yangı öncesi sitokinlerin (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) sentezi ve salınımı artması olabilir.

Bu çalışma sonucunda MDA, NO, Hsp-27 ve IL-6'nın anaplasmosisin tanısı ve prognozunun takip edilmesinde faydalı olabileceği düşünülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Abbott JR, Palmer GH, Kegerreis KA, Hetrick PF, Howard CJ, Hope JC, Brown WC**, Rapid and Long-Term Disappearance of CD4 T Lymphocyte Responses Specific for *Anaplasma Marginale* Major Surface Protein-2 (MSP2) in MSP2 Vaccinates following Challenge advanced glycosylation end products on IL-6 production by human monocytes, **1987**, 45:337-351
2. **Allen PC, Kuttler KL, Amerault TE**, Clinical chemistry of anaplasmosis: comparative serum protein changes elicited by attenuated and virulent *Anaplasma marginale* isolates, *Am.J.Vet.Res*, **1981**, 42(2):326-8
3. **Altan N, Dinçel AS, Koca C**, Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres, *Turk J Biochem*, **2006**, 31(2): 51–56
4. **Anonim**, Heat shock proteins-structure and overview. Erişim adresi: <http://www.cs.stedwars.edu/chem/Chemistry/chem43/chem43/hsp/structure>. Erişim Tarihi:03.03.2006
5. **Anonim**, Oie, Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, bovine anaplasmosis, <http://www.oie.int/Eng/normes/mmanual/A-00058.htm> erişim tarihi:12.10.2007
6. **Archer S**, Measurement of nitric oxide in biological models *The FASEB Journal*, **1993**, 7:349-360
7. **Arslan HH, Nisbet C, Sarıpınar D, Çenesiz D, Çenesiz M**, Sığırlarda Asetilmetiyonin, L-Karnitin, Vitamin E ve Vitamin B Kombinasyonunun Bazı Klinik, Hematolojik ve Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkisi, *Yyü vet fak derg*, **2008**, 19(1): 9-14
8. **Ayerdem B, İnci A, Uyanık F, İça A, Çakmak A, Yıldırım A**, sığırlarda doğal *theileria annulata* enfeksiyonlarında monosit nitrik oksit düzeyleri, *journal of health sciences*, **2006**, 15(2): 116-121
9. **Barrett KE**, Cytokines: sources, receptors, and signaling. *Baillieres Clin Gastroenterol* **1996**, 10:1-15
10. **Baumann H, Wang Y, Morella KK**, Complex of the soluble IL-11 receptor and IL-11 acts as IL-6-type cytokine in hepatic and nonhepatic cells. *J Immunol*, **1996**, 35:284-290
11. **Birdane F, Sevinç F, Derinbay Ö**, *Anaplasma marginale* infections in dairy cattle: clinical disease with high seroprevalence, *Bull Vet Inst. Pulawy*, **2006**, 50(4): 467-470
12. **Bock RE, De Vos AJ, Molley JB**, Tick-borne diseases of cattle. Austrian and Zealand diagnostic procedure, 1-29, erişim tarihi:05.03.2006, erişim adresi. <http://scahlsorgau/standardprocedures/terrestrial/tick-borne-diseases.pdf>.
13. **Brown WC, McElwain TF, Ruef BJ, Suarez CE, Shkap V, Chitko-mckown CG, Tuo W, Rice-ficht AC, Palmer GH**, *Babesia bovis* Rhostry-Associated Protein 1 Is Immunodominant for T Helper Cells of Immune Cattle and Contains T-Cell Epitopes Conserved among Geographically Distant *B. bovis* Strains, *Infection and immunity*, **1996**, 64(8):3341-3350
14. **Burtis CA, Ashwood ER**, editors *Tietz text book of Clinical chemistry*, WB sounders, **1999**, 1840-41-44-45;1799-1834-35
15. **Callard R, Gearing A**. *The Cytokine Facts Book*. Orlando, Academic Press, **1994**
16. **Carcy B, Precigout E, Valentin A, Gorenflot A, Reese RT ve ark.**, Heat shock response of *Babesia divergens* and identification of the Hsp 70 as an immunodominant early antigen during ox, gerbil and human babesiosis. *Biol Cell*, **1991**, 72:93-102



17. **Ciocca DR, Oesterreich S, Chamness GC, McGuire WL, Fugua SA**, Biological and clinical implications of heat shock protein 27 (Hsp27): J Natl Cancer Inst. **1993**, 6;85(19):1558-70
18. **Clark JI, Muchowski PJ**, Small heat shock proteins and their potential role human disease. Curr Opin Biol, **2000**; 10(1): 52-9
19. **Clarkson PM, Thompson HS**, Antioxidants: What Role Do They Play In Physical Activity And Health?.Am. J. Clin. Nutr, **2000**, 72:637-646
20. **Cunha BA, Crean J, Rosenbaum G**. Lipid abnormalities in babesiosis. Am. J. Med, **2000**, 108:758-759
21. **Daftarian P M, Kumar A, Kryworuchko M, Diaz-Mitoma F**, IL-10 production is enhanced in human T cells by IL-12 and IL-6 and in monocytes by tumor necrosis factor-alpha. J. Immunol, **1996**, 157:12-20
22. **Das BS, Thurnham DI, Patnaik JK, Das DB, Saipathy R ve ark.**, Increased plasma lipid peroxidation in riboflavin-deficient, malaria-infected children, Am. J.Clin. Nutr., **1990**, 51:859
23. **Dinerello CA**, Proinflammatory cytokines. Chest, **2000**, 118(2): 503-508
24. **Dweik R**. The promise and reality of nitric oxide in the diagnosis and treatment of lung disease. Clev Clin J Med, **2001**, 68:486-493
25. **Erbaş D**, Nitrik oksit :Fizyolojik önemi ve çeşitli Hastalıklardaki Rolü.Klinik Gelişim II, **1998**, 1:376-80
26. **Erel Ö, Koçyiğit A, Bulut V, Gürel SM, Avcı Ş ve ark.**, Şark Çıbanlı Hastalarda Reaktif Nitrojen ve Oksijen Radikal Metabolizması. *Klinik Bilimler* **1999**, 5(3):298-302
27. **Fakruddin JM, Biswas S, Sharma YD**, Metalloprotease Activity in a Small Heat Shock Protein of the Human Malaria Parasite *Plasmodium vivax*, Infect Immun, **2000**, 68(3):1202–1206
28. **Ferns G, Shams S, Shafi S**. Heat shock protein 27: its potential role in vascular disease. Int J Exp Pathol, **2006**, 87(4):253-74
29. **Figueroa JV, Alvarez JA, Ramos JA, Rojas EE, Santiago C. ve ark.**, Bovine babesiosis and anaplasmosis follow-up on cattle relocated in an endemic area for hemoparasitic diseases, Ann. N. Y. Acad. Sci., **1998**, 849:1-10
30. **Foil LD**, Tabanids as vectors of disease agents. *Parasitol Today*,**1989**, 5(3): 88-96
31. **Fox JC**, Veterinary Clinical Parasitology Images, [instruction.cvhs.okstate.edu/Lst21\\_30.htm](http://instruction.cvhs.okstate.edu/Lst21_30.htm), erişim tarihi 10.09.2008
32. **Gale KR, Leatch G, Dimmock CM, Wood PR**, Anaplama marginale effect of cattle with an interferon gama neutralizing monoclonal antibody or the nitric oxide syntetase inhibitor aminoguanidine on the course of infection, parasite immunity, **1997**, 19:411-417
33. **Goff WL, Johnsan WC, Parish SM, Barrigton GM, Elsasser TH, Davis WC, Valdez RA**, IL-4 and IL-10 inhibition of IFN-gama and tnf-alfa dependent nitric oxide production from bovine mononuclear phagocytes exposed to babesia bovis merozoites,vet. immun immupatoloji, **2002**, 84:237-251
34. **Goff WL, Jonhson WC, Valdez RA**, 12-14 and TL-10 inhibition of IFN-gama and TNF-alfa dependent nitric oxide production from bovine mononuclear phagocytes exposed to Babesia bovis merazoites. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **2002**, 84(3-4): 237-251

35. **Gottstein B, Bettens F**, Nitric Oxide in Cerebral Malaria, *The Journal of Infectious Diseases*, **1994**, 169:1417-8
36. **Grab DJ, Elvis Nyarko, Barat NC, Nikolskaia OV, Dumler JS**, Anaplasma phagocytophilum-Borrelia burgdorferi Coinfection Enhances Chemokine, Cytokine, and Matrix Metalloprotease Expression by Human Brain Microvascular Endothelial Cells *clinical and vaccine immunology, clin vaccine immunal*, **2007**, 14(11):1420–1424
37. **Granger DN, Stokes KY**. Role of Nitric Oxide in Ischemia-Reperfusion Injury. Ignarro LJ(Ed). *Nitric Oxide Biology and Pathobiology*. Academic Press London, UK, **2000**, 76:633-647
38. **Grewal A, Ahuja CS, Singha SPS, Chaudhary KC**, Status of lipid peroxidation, some antioxidant enzymes and erythrocytic fragility of crossbred cattle naturally infected with Theileria annulata. *Vet Res Commun*. **2005**, 29(5):387-94
39. **Harmankaya AÇ, Aydın A, Işimer A**, Serbest radikaller ve oksidanlar savunma sistemi.Gata basımevi, Ankara **2001**, 48(20):31-37
40. **Henle KJ, Jethmalani SM, Nagle WA**, Stres proteins and glycoproteins. *Int J Mol Med Jan*, **1998**, 1(1):25-32
41. **Hopkins FM, Gill Warren, Orr Milton**, Anaplasmosis in cattle, animal science,info series:AS-B 288 the university of tennessee extension, **2004**, 45:87-90
42. **Houslay M D, Wallace AV, Marchmont RJ, Martin BR, Heworth CM**, Adu. Cyclic Nucleotide Protein Phospho-rylation Res, **1984**, 16:159-176
43. **Howe LM, Boothe HW**, Nitric oxide :A review for Veterinary Surgeons. *Veterinary Surgery*, **2001**, 30:44
44. **Ikeda U, Ito T, Shimada K**, Interleukin-6 and acute coronary syndrome. *Clin Cardiol*. **2001**, 24:701-4.
45. **Jááttelá M**, Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Annali medici*, **1999**, 31:261-271
46. **Jeannin P, Lecoanet S, Delneste Y, Gauchat JF, Bonnefoy JY**. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J Immunol*, **1998**, 160(7):3555–61
47. **Kappe G, Franck E, Verschuure P, Boelens WC, Leunissen JAM, De Jong WW**. The human genome encodes 10 alpha-crystallin-related small heat shock proteins: HspB1-10. *Cell Stress & Chaperones*, **2003**, 8:53-61
48. **Keleş İ, Değer S, Altuğ N, Karaca M, Akdemir C**, Tick-borne diseases in cattle: Clinical and haematological findings, diagnosis, treatment, seasonal distribution, breed, sex and age factors and the transmitters of the diseases. *Yeni Yüzyıl Üniversitesi Vet. Fak. Derg*, **2001**, 12 (1-2): 26-32
49. **Kızıl Ö, Karapınar T, Balıkcı E, Kızıl M**. Tropikal Tayleriyozisli Sığırlarda Hemogram ve Bazı Serum Parametrelerindeki Değişiklikler. *F. Ü. Sağ. Bil. Derg*, **2007**, 21 (1):11 –14
50. **Kishimoto T, Akira S, Taga T, Narazaki M**, Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*, **1995**, 86:1243-1254
51. **Known NS, Stuehr DJ, Nathan CF**, Inhibition of Tumor Cell Ribonucleotide Reductase by Macrophage Derived Nitric Oxide. *J Exp Med*, **1991**, 174: 761-8

52. **Kocan KM, De la Fuente J, Alberto A, Guglielmono AA, Meléndez RD**, Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle, *Clinical Microbiology Reviews*, **2003**, 16(4): 698-712
53. **Kocan KM**, Development of *Anaplasma marginale* in ixodid ticks: coordinated development of a rickettsial organism and its tick host, *In J. R. Sauer and J. A. Hair (ed.), Morphology, physiology and behavioral ecology of ticks*. Ellis Horwood Ltd., Chichester, United Kingdom, **1986**, 25:472-505
54. **Kocan KM, Blouin EF, Barbet AE**, Anaplasmosis control: past, present, and future, *Ann NY Acad Sci.*, **2000**, 916: 501-509
55. **Kontaş T, Salmanoğlu B**, Tumour necrosis factor- $\alpha$ , adenosine deaminase and nitric oxide levels in cattle babesiosis before and after treatment, *Bull Vet Inst Pulawy*, **2006**, 50:485-487
56. **Kontaş AT, Salmanoğlu B, Çakmak A, Beşkaya A**. Relative changes in serum lipid-lipoprotein and trace element levels in cattle babesiosis. *Medycyna Wet*, **2008**, 64(9) :1104-1106
57. **Köken T, Serteser M, Kahraman A**, Sigaranın Hemodiyaliz hastalarında oksidatif stres üzerine etkisi. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, **2002**, 2(2): 121-124
58. **Laad AD, Thomas ML, Fakih AR, Chiplunkar SV**, Human gamma delta T cells recognize heat shock protein-60 *Int j Cancer*, **1999**, 1;80(5):709-14
59. **Locke M**, The cellular stress response to exercise: role of stress proteins. *Exercise and sport sciences reviews*, **1997**, 25:105-136
60. **Lyke KE, Burges R, Cissoko Y, Sangare L, Dao M ve ark.**, Serum Levels of the Proinflammatory Cytokines Interleukin-1 Beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8, IL-10, Tumor Necrosis Factor Alpha, and IL-12(p70) in Malian Children with Severe *Plasmodium falciparum* Malaria and Matched Uncomplicated Malaria or Healthy Controls, *Infect Immun*, **2004**, 72(10): 5630–5637
61. **Male D, Cooke A, Owen M, Trowsdale J, Champion B**, *Advanced Immunology*, St Louis, C.V. Mosby, **1996**, 4:273
62. **Mallat Z, Heymes C, Ohan J, Faggin E, Leseche G, Tedgui A**:expression of interleukin 10 in advanced human atherosclerotic plaques:relation to inducible nitric oksit synthase expression and cell dead, *arterioscler thromb vasc biol*, **1999**, 19(3):611-6
63. **Mason PJ, Shiels BR, Tait A, Beck P, Hall R**. Sequence and expression of a gene from *Theileria annulata* coding for a 70-kilodalton heat-shock protein, *Mol Biochem Parasitol*, **1989**, 37(1):27-35
64. **May JM, Qu ZC, Mendiratta S**, Protection and recycling of alfa-tocopherol in human erythrocytes by intracelluler ascorbic acid. *Arch, Biochem. Biophys*, **1998**, 349:281-289
65. **Mercan U, Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi**, Yüzüncü yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, **2004**, 15:91-96
66. **Mimioğlu M, Göksu K, ve Sayın F**, Veteriner ve Tıbbi Protozooloji II. Ankara Üniversitesi Vet. Fak. Yay. 248, Ders Kitabı 134, Ankara Üniv. Basımevi, **1969**, 1313 s
67. **Moncada S, Higgs A**, The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *N. Engl. J.Med*, **1993**, 10:521-525
68. **Morohoshi M, Fujisawa K, Uchimura I, Numano F**, The effect of glucose and advanced glycosylation end products on IL-6 production by human monocytes, *Ann N Y Acad Sci*, **1995**, 748:562-70

69. **Moseley P**, Stress proteins and the immune response. Erişim adresi: [www.elsevier.com/locate/immpharm](http://www.elsevier.com/locate/immpharm). Erişim Tarihi:03.03.2006
70. **Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T**, The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res*, **2002**, 4(3):233-242
71. **Nqemfo EL, Dimo T, Donqmo AB, Azabaze AG, Alaoui K ve ark.**, Antioxidative and anti-inflammatory activities of some isolated constituents from the stem bark of allanblodi monticola staner LC, Imflammophormocology, department of animal biology and physiology, **2008**, 45:23-25
72. **Ohno Y, Aoki N, Nishimura A**, In vitro production of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, **1993**, 77: 1072-1077
73. **Oral U, Arıboğan A**, Septik şokta Nitrik Oksitin Etkileri. *Türk Anet. Rean Cem. Mecmuası*, **1995**, 23:268-275
74. **Ozan TS, Yaraloğlu S, Yılmaz S, Özer E, şaki CE, Sevgili M**, Theileria annulata ile enfekte sığırarda GSH-PX, G6PD, Arginaz aktiviteleri ile bazı biyokimyasal parametreler, *TR.J. of veterinary and animal sciences*, **1998**, 64:45-47
75. **Ozkan M, Dweik R**. Nitric Oxide and Airway Reactivity. *Clin Pulm Med*, **2001**, 8:199
76. **Özakyol AH**, Nitric Oksid, Gastrointestinal sistem ve Karaciğer, *Sendrom*, **1998**, 8:74-78
77. **Özkan M, Yüksekol İ**, Nitrik Oksit ve Akcigerler, *Toraks Dergisi*, **2003**, 4(1):88-94
78. **Pockley AG**, Heat shock proteins in health and disease:therapeutic agents?. Erişim adresi: <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>. 21.09.2001, Erişim Tarihi:03.03.2006
79. **Potgieter FT**, Tick transmission of anaplasmosis in South Africa. *In Proceedings of the International Conference on Tick Biology and Control*, 27-29, **1981**, Grahamstown, South Africa, 245:53-56
80. **Rader DJ**, Inflammatory markers of coronary risk. *N Engl J Med*, **2000**, 343:1179-1182
81. **Ramiro-Puiq E, Urpi-Sarda M, Perez-Cano FJ, Franch A, Castellote C ve ark.**, Cocoa-enriched diet enhances antioxidant enzyme activity and modulates lymphocyte composition in thymus from young rats, *J Agric food chem*, **2007**, 8;55(16):6431-8
82. **Reyna-bello A, Cloeckert A, Vizcaino N, Gonzatti MI, Aso PM ve ark.**, Evaluation of enzyme linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5 for serological diagnosis of bovine anaplasmosis in venezuela,clinical and diagnostic laboratory, **1998**, 259-262: 5(2)
83. **Richey EJ, Palmer G**, Anaplasmosis in beef cattle, <http://edis.ifas.ufl.edu/VM036>, erişim tarihi:03.02.2007
84. **Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G**, Regulation of Hsp27 Oligomerization, Chaperone Function, and Protective Activity against Oxidative Stress/Tumor Necrosis Factorá by Phosphorylation. *J Biol Chem*, **1999**, 274( 27), 18947-18956
85. **Selleri C, Macregewski JP**.Nitric Okxide and cell survival: Megakaryocytes, *J. Lab. Clin. Med.* **2001**, 137: 225-231
86. **Shoda KM, Palmer GH, Florin-christensen J, Forin-christensen M, Godson DL ve ark.**, Babesia bovis-Stimulated Macrophages Express Interleukin-1β, Interleukin-12, Tumor Necrosis Factor Alpha, and Nitric Oxide and Inhibit Parasite Replication in Vitro Infection and Immunity, **2000**, 68 (9): 5139-5145

87. **Slater TF**, Overview of Methods Used for Detecting Lipid Peroxidation Methods in Enzymology, edited by Parker L, **1984**, 105:283-293
88. **Stich WR, Shoda LKM, Dreewess M, Adler B, Thomas W ve ark.**, Stimulation of Nitric Oxide Production in Macrophages by *Babesia bovis*, infection and immunity, **1998**, 66(9): 4130–4136
89. **Stokka GL, Falkner R, Boenning JV**, Anaplasmosis agricultural experiment station and cooperative extention service, kansas state university, **2000**, <http://www.oznetiksu.edu/library/LVSTK2MF212.pdf>.
90. **Tuna R, Çağlayan GB**, Nitrik Oksid – I. Sendrom, **1995**, 42:25-28
91. **Tutluoğlu B, Gümüştas M.K, Müsellim B, Yılmaz BK, Anakaya AN ve ark.**, Bronşial astımda nazal lavajda nitrik oksit metabolitleri. Türk ORL arşivi **2000**, 38(1):45-50
92. **Ulutaş PA, Voyvoda H, Ulutaş B, Aypak S**, Miks Helmint Enfeksiyonlu Keçilerde Haptoglobin, Serum Amiloid-A ve Seruloplazmin Konsantrasyonları, **2008**, 32( 3):229-233
93. **Uysal M**, Serbest radikaller, lipid peroksitleri ve organizmada prooksidanantioksidan dengeyi etkileyen koşullar. Klinik Gelişim, **1998**, 11:336-341
94. **Wilkinson R**, Bovine anaplasmosis, **2005**, erişim adresi: [http://www.vet.ksu.edu/depts/vmtc/agpract/articles/bovine anaplasmosis.pdf](http://www.vet.ksu.edu/depts/vmtc/agpract/articles/bovine_anaplasmosis.pdf), erişim tarihi: 10.10.2006
95. **Yagi K**, Lipid Peroxides and Human Diseases. Cliem. and Phy of Lipids, **1987**, 45(2-4):337-51
96. **Yılmaz N, Solmaz S, Kaya M**, Nitrik Oksitin İnsan Organizmasındaki Önemi. Erişim Adresi: <http://lokman.cu.edu.tr/med/dergiler/arşiv/A2001-2/>
97. **Wren BW**, Microbial genome analysis: insights into virulence, host adaptation and evolution, Nat. Rev. Genet, **2000**, 1:30-39
98. **Zhang M, Hisaeda H, Sakai T, Ishikawa H, Hao YP, Nakano Y, Ito Y, Himeno K**, Macrophages expressing heat-shock protein 65 play an essential role in protection of mice infected with *Plasmodium yoelii* , Immunology, **1999**, 97:611–615
99. **Zygner W, Rapacka G, Gojska-Zygner O, Dtugosz E, Wedrychowicz H**, Biochemical abnormalities observed in serum of dogs infected with large Babesia in Warsaw, Division of Parasitology and Parasitic Diseases, Department of Preclinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, **2007**, 48:908-912

## **ÖZGEÇMİŞ**

1980 yılında Antakya'da doğdu. İlk orta ve lise öğrenimini Antakya'da tamamladı. 1999-2003 yıllarında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünü bitirdi. 2004-2005 yıllarında Çukurova Üniversitesi Fenbilimleri Enstitüsünde tezsiz yüksek lisansını tamamladı.