T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Veteriner İç Hastalıkları Anabilim Dalı

KAZEÖZ LENFADENİTİSE KARŞI AŞILANAN KUZULARDA E VİTAMİNİ VE SELENYUM KOMBİNASYONUNUN OKSİDATİF CEVAP ÜZERİNE ETKİLERİ

Hazırlayan
Kayacan SEYRANOĞLU

Danışman
Doç. Dr. Öznur ASLAN

Doktora Tezi

Ocak 2015
KAYSERİ

T.C.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

VETERİNER İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

KAZEÖZ LENFADENİTİSE KARŞI AŞILANAN KUZULARDA E VİTAMİNİ VE SELENYUM KOMBİNASYONUNUN OKSİDATİF CEVAP ÜZERİNE ETKİLERİ

Hazırlayan

Kayacan SEYRANOĞLU

Danışman

Doç. Dr. Öznur ASLAN

Doktora Tezi

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TSD-12-3811 numaralı proje ile desteklenmiştir

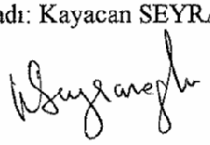
Ocak 2015

KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Kayacan SEYRANOĞLU

İmza: 

Tarih:

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

Kazeöz Lenfadenitise Karşı Aşılanan Kuzularda E Vitamini ve Selenyum Kombinasyonunun Oksidatif Cevap Üzerine Etkileri adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Kayacan SEYRANOĞLU

Danışman

Doç. Dr. Öznur ASLAN

İç Hastalıkları ABD Başkanı

Prof. Dr. Vehbi GÜNEŞ

Doç. Dr. Öznur ASLAN danışmanlığında **Kayacan SEYRANOĞLU** tarafından hazırlanan "**Kazeöz Lenfadenitise Karşı Aşılanan Kuzularda E Vitamini ve Selenyum Kombinasyonunun Oksidatif Cevap Üzerine Etkileri**" adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner İç Hastalıkları Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

08/01/2015

JÜRİ

Danışman	: Doç. Dr. Öznur ASLAN	(ERÜ Vet. İç. Hst. ABD)
Üye	: Prof. Dr. Vehbi GÜNEŞ	(ERÜ Vet. İç. Hst. ABD)
Üye	: Prof. Dr. Murat KANBUR	(ERÜ Vet. Farm.-Toks. ABD)
Üye	: Doç. Dr. Ali Haydar KIRMIZIGÜL	(KAÜ Vet. İç. Hst. ABD)
Üye	: Doç. Dr. Ali Cesur ONMAZ	(ERÜ Vet. İç. Hst. ABD)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ..... tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

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

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ / TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca farklı bakış açıları ve bilimsel katkılarıyla beni aydınlatan, yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve bu günlere gelmemde en büyük katkı sahibi sayın hocam Doç. Dr. Öznur ASLAN'a,

Doktora çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. İhsan KELEŞ, Prof. Dr. Vehbi GÜNEŞ ve Doç. Dr. Ali Cesur ONMAZ'a,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında karşılaştığım zorlukları aşmamda yardımlarından dolayı Prof. Dr. Murat KANBUR, Prof. Dr. Gökhan ERASLAN, Prof. Dr. Meryem EREN, Doç. Dr. K. Semih GÜMÜŞSOY, Yrd. Doç. Dr. Mürsel KARABACAK ve Araştırma Görevlisi Duygu YAMAN'a;

İstatistik çalışmalarımda yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Aytaç AKÇAY'a,

Çalışmada kullanılan deneme hayvanlarını sağlayan Kayseri İli Pınarbaşı İlçesi Avşarpotuklu Mahallesi koyun yetiştiricilerinden Yaşar ATAŞ'a;

Bu tez çalışmasına maddi destek veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: TSD-12-3811) teşekkür ederim.

Ayrıca; çalışmalarım süresince sabır göstererek beni daima destekleyen aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Kayacan SEYRANOĞLU

Kayseri, Ocak 2015

KAZEÖZ LENFADENİTİSE KARŞI AŞILANAN KUZULARDA E VİTAMİNİ VE SELENYUM KOMBİNASYONUNUN OKSİDATİF CEVAP ÜZERİNE ETKİLERİ

Kayacan SEYRANOĞLU

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Ocak 2015

Danışman: Doç. Dr. Öznur ASLAN

ÖZET

Çalışmada, kazeöz lenfadenitise (KLA) karşı aşılanan kuzularda E vitamini ve selenyum (Se) kombinasyonunun oksidatif cevap üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla, 40 adet, sağlıklı, 2 aylık, dişi, KLA'ya karşı aşılanmamış Akkaraman ırkı kuzu kullanıldı. Kuzular rastgele dört eşit gruba ayrıldı: Grup I: Kontrol, Grup II: Aşı, Grup III: E vitamini+Se, Grup IV: Aşı+E vitamini+Se. Gruplardan uygulamadan hemen önce ve uygulamadan 21 gün sonra kan numuneleri alındı. Oksidatif cevabın tespit edilmesi amacıyla malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve nitrik oksit (NO) ölçümleri yapıldı. Aşılama öncesi ve aşılamadan 21 sonra *Corynebacterium pseudotuberculosis*'e karşı oluşan IgG düzeyleri ELISA ile ölçüldü.

Günler arası değerler karşılaştırıldığında: MDA ve IgG seviyeleri değişmedi ($P>0,05$); GSH-Px ($P<0,05$) ve NO ($P<0,001$) tüm gruplarda düştü; CAT Grup I, II ve IV'de düştü ($P<0,001$), SOD Grup I'de diğer gruplara göre yükselme gösterdi ($P<0,05$).

Gün içi değerler karşılaştırıldığında: MDA, GSH-Px, NO ve IgG değerlerinde fark tespit edilmedi ($P>0,05$). 0.günde CAT değerleri bakımından, Grup III ile Grup I, II, IV arasındaki fark önemli bulundu ($P<0,05$). 21.günde diğer gruplara göre, Grup I'de SOD değeri daha yüksek ($P<0,05$), CAT değeri ise daha düşük ($P<0,05$) bulundu.

Sonuç olarak; kazeöz lenfadenitise karşı aşılanan Akkaraman ırkı kuzularda, E vitamini+Se kombinasyonunun MDA, SOD, CAT, GSH-Px ve NO parametreleri üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı belirlendi.

Anahtar Kelimeler: E vitamini, Kazeöz Lenfadenitis, Kuzu, Oksidatif cevap, Selenyum

EFFECTS OF VITAMIN E AND SELENIUM COMBINATION ON OXIDATIVE RESPONSE IN LAMBS VACCINATED AGAINST CASEOUS LYMPHADENITIS

Kayacan SEYRANOĞLU

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Veterinary Internal Medicine

Doctorate Thesis, January 2015

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Öznur ASLAN

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the effects of vitamin E and selenium (Se) combination on oxidative response in lambs vaccinated against caseous lymphadenitis (CLA). For this purpose; 40, two-month-old female, clinically healthy, Akkaraman lambs unvaccinated against CLA were used. Lambs were randomly divided into 4 equal groups. Group I: Control, Group II: Vaccine; Group III: Vitamin E+Se; Group IV: Vaccine + Vitamin E+Se. Blood samples were collected on 0th and 21st days. In order to determine oxidative response, malondialdehyde (MDA), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and nitric oxide (NO) parameters were measured. Immunoglobulin G (IgG) against *Corynebacterium pseudotuberculosis* on day 0th and day 21st was measured by ELISA.

When values between day 0th and day 21st compared: MDA and IgG showed no change ($P>0,05$); GSH-Px ($P<0,05$) and NO ($P<0,001$) decreased in all groups; SOD increased in Group I ($P<0,05$) and CAT decreased in Group I, II and IV ($P<0,001$).

When values within the same day compared: MDA, GSH-Px, NO and IgG values showed no difference ($P>0,05$). On day 0th, CAT values showed significant difference between Group III and Group I, II, IV ($P<0,05$). On day 21st, Group I SOD level was higher ($P<0,05$) and CAT was lower ($P<0,05$) than other groups.

In conclusion; in Akkaraman lambs vaccinated against caseous lymphadenitis administration of vitamin E+Se combination had no significant effect on the MDA, SOD, CAT GSH-Px and NO parameters.

Keywords: Caseous Lymphadenitis, Vitamin E, Oxidative Response, Lamb, Selenium

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI iii
KABUL VE ONAY SAYFASI iv
ÖNSÖZ / TEŞEKKÜR v
ÖZET vi
ABSTRACT vii
İÇİNDEKİLER viii
KISALTMALAR VE SİMGELER xii
TABLO VE ŞEKİLLER LİSTESİ xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 2
2.1. KAZEÖZ LENFADENİTİS 2
2.1.1. ETİYOLOJİ 2
2.1.1.1. Sınıflandırma 2
2.1.1.2. Mikrobiyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri 3
2.1.1.3. Antimikrobiyel Maddelere Duyarlılık 3
2.1.1.4. Virülenslik Faktörleri 4
2.1.1.4.1. Fosfolipaz D Egzotoksini 4
2.1.1.4.2. Hücre Duvarı Lipidleri 4
2.1.1.4.3. Fag A, B, C ve D Genleri 4
2.1.2. EPİDEMİYOLOJİ 5
2.1.2.1. Doğada ve Konakçıda Canlı Kalabilme 5
2.1.2.2. Yetiştirme ve Irk 5
2.1.2.3. Konakçıda Yayılma ve Bulaşma 6
2.1.2.4. Prevalans 6
2.1.3. PATOGENEZ 7
2.1.4. SEMPTOMLAR 8
2.1.5. LABORATUVAR BULGULARI 9
2.1.5.1. Patoloji ve Histopatoloji 9
2.1.5.2. Mikrobiyoloji 10
2.1.5.3. Biyokimya 11

2.1.6. TEŞHİS 11
2.1.6.1. Anamnez ve Klinik Bulgular 11
2.1.6.2. Mikrobiyoloji 12
2.1.6.3. Diğer Laboratuvar ve Tarama Testleri 12
2.1.6.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu 13
2.1.6.3.2. ELISA Testi 13
2.1.6.3.3. İnterferon- gamma Testi 14
2.1.6.3.4. Deri Alerji Testleri 14
2.1.6.3.5. Biyokimya Testleri 15
2.1.7. AYIRICI TANI 15
2.1.8. TEDAVİ 16
2.1.9. BAĞIŞIKLIK 16
2.1.9.1. Humoral Bağışıklık 16
2.1.9.2. Hücresel Bağışıklık 17
2.1.10. KORUMA VE KONTROL 19
2.2. OKSİDATİF STRES VE BAĞIŞIKLIK 22
2.2.1. Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri 22
2.2.2. Reaktif Oksijen Türleri Kaynaklı Hücre Hasarı 24
2.2.3. Lipid Peroksidasyon 24
2.2.3.1. Malondialdehit 25
2.2.4. Protein Hasarı 26
2.2.5. DNA Hasarı 27
2.2.6. Antioksidanlar 27
2.2.6.1. Süperoksit Dismutaz 28
2.2.6.2. Katalaz 29
2.2.6.3. Glutasyon Peroksidaz 30
2.2.6.4. Glutasyon Redüktaz 31
2.2.7. Nitrik Oksit 32
2.2.8. E Vitamini ve Selenyumun, Oksidatif Stres ve Bağışıklık Üzerindeki Etkileri 33
3. GEREÇ VE YÖNTEM 39
3.1. Gereç 39
3.2. Yöntem 39

3.2.1 Kan Örneklerinin Alınması ve İşlenmesi 40
3.2.2. Eritrositlerin Hemoliz Edilmesi 40
3.2.3. Eritrosit Hemoglobin Düzeyi Ölçümü 40
3.2.3.1. Yöntemin Prensibi 40
3.2.3.2. Testin Yapılışı 40
3.2.3.3. Sonuçların Okuması ve Yorumlanması 41
3.2.4. Plazma Malondialdehit Ölçümü 41
3.2.4.1. Yöntemin Prensibi 41
3.2.4.2. Testin Yapılışı 41
3.2.4.3. Sonuçların Okuması ve Yorumlanması 41
3.2.5. Eritrosit Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Ölçümü 41
3.2.5.1. Yöntemin Prensibi 41
3.2.5.2. Testin Yapılışı 42
3.2.5.3. Sonuçların Okuması ve Yorumlanması 42
3.2.6. Eritrosit Katalaz Aktivitesi Ölçümü 42
3.2.6.1. Yöntemin Prensibi 42
3.2.6.2. Testin Yapılışı 42
3.2.6.3. Sonuçların Okuması ve Yorumlanması 43
3.2.7. Eritrosit Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi Ölçümü 43
3.2.7.1. Testin Prensibi 43
3.2.7.2. Testin Yapılışı 43
3.2.7.3. Sonuçların Okuması ve Yorumlanması 43
3.2.8. Plazma Nitrik Oksit Aktivitesinin Ölçülmesi 43
3.2.8.1. Yöntemin Prensibi 44
3.2.8.2. Testin Yapılışı 44
3.2.8.3. Sonuçların Okuması ve Yorumlanması 44
3.2.9. İmmunglobulin G Antikorlarının ELISA İle Tespit Edilmesi 44
3.2.9.1. Yöntemin Prensibi 44
3.2.9.2. Testin Yapılışı 44
3.2.9.3. Sonuçların Okuması ve Yorumlanması 45
3.2.10. İstatistiksel Analiz 45
4. BULGULAR 46
4.1. Malondialdehit 46

4.2. Süperoksit Dismutaz 48
4.3. Katalaz 50
4.4. Glutasyon Peroksidaz 52
4.5. Nitrik Oksit 54
4.6. Kazeöz Lenfadenitis IgG ELISA sonuçları 56
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 58
5.1. Tartışma 58
5.2. Sonuç ve Öneriler 62
6. KAYNAKLAR 63
ETİK KURUL ONAYI
ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR VE SİMGELER

Sembol	Anlamı
α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
μ	mikro
γ-GT	Gamma-glutamil transferaz
4-HNE	Hidroksi noneal 4
AIDS	Edinilmiş bağışıklık yetmezliği sendromu
AP-1	Aktivatör protein-1
BAL	Bronkoalveolar lavaj
BUN	Kan üre nitrojeni
CAT	Katalaz
CDV	Canine distemper virüsü
C-ELISA	Hüre duvarı-ELISA
CMN	*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* ve *Rhodococcus*
cfu	Koloni oluşturma birimi
Con A	Concavalin A
C. pseudotuberculosis	*Corynebacterium pseudotuberculosis*
CPV	Canine parvovirüs
CR3	Tip 3 kompleman reseptörü
Cu	Bakır
$CuCl_2$	Bakır klorit
CuZnSOD	Bakır-çinko süperoksit dismutaz
DNA	Deoksiribonükleik asit

Sembol	**Anlamı**
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
FAD	Flavin adenin dinükleotit
Fe	Demir
FKA	Freund's complete adjuvant
FLD	Fosfolipaz D
gr	Gram
GSH	Redükte glutasyon
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GSH-Rd	Glutasyon redüktaz
GSSG	Okside glutasyon
H^+	Hidrojen atomu
H_2O_2	Hidrojen peroksit
Hb	Hemoglobin
HOCl	Hipokloröz asit
HRP	Horse radish peroksidaz
IBRV	Enfeksiyöz bovine rhinotracheitis virüsü
IFN-gamma	İnterferon-gamma
IgA	İmmunglobulin A
IgG	İmmunglobulin G
IgM	İmmunglobulin M
IL-1β	İnterleukin-1β
INF-γ	İnterferon gamma
IU	internasyonal ünite
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz

Sembol	**Anlamı**
$K_3Fe(CN)_6$	Potasyum ferrisiyanit
KCN	Potasyum siyanit
kDa	kilodalton
kg	Kilogram
KH_2PO_4	Potasyum hidrojen fosfat
l	Litre
KLA	Kazeöz lenfadenitis
LDH	Laktat dehidrojenaz
$LOOH^-$	Lipid hidroperoksit
mAb	Monoklonal antikor
MAPK	Mitojenle aktive protein kinaz
MCP -1	Monosit chemoattractant protein 1
MDA	Malondialdehit
meso-DAP	Mezo-diaminopimelik asit
mg	Miligram
ml	Mililitre
mmol	Milimol
Mn	Mangan
MnSOD	Mangan süperoksit dismutaz
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
NAC	N-asetilsisteyin
nmol	Nanomol
nm	Nanometre
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
$NaHCO_3$	Sodyum bikarbonat

Sembol	Anlamı
$NaNO_3$	Sodyum nitrat
NaOH	Sodyum hidroksit
NBT	Nitroblue tetrazoliumkloridin
NED	N-(1-naftil) etilendiamin
NF-*k*B	Nükleer faktör-kappa B
NDV	Newcastle disease virüsü
O^2	Moleküler oksijen
$O2^{-1}$	Süperoksit
$^1O_2$	Singlet oksijen
OH^-	Hidroksil
$ONOO^-$	Peroksinitrit
PGF2α	Prostoglandin F2α
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PI3V	Parainfluenza 3 virüsü
RO^-	Alkoksil
ROO-	Peroksil
ROT	Reaktif oksijen türleri
rFLD	Rekombinant fosfolipaz D
SAA	Serum amiloid A
Se	Selenyum
SGOT	Serum glutamik oksaloasetik transaminaz
SGPT	Serum glutamik pirüvik transaminaz
SH-	Sülfhidril
SOD	Süperoksit dismutaz
STLA-4	Sitotoksik T-Lenfosit Antijen–4

Sembol	**Anlamı**
TBA	Tiyobarbitürik asit
t-BOOH	t-bütil hidroperoksit
TCA	Triklor asetik asit
T-ELISA	Toksin-ELISA
Th1	Yardımcı T lenfositi 1
TNF-α	Tümör nekrozis faktör-alfa
Zn	Çinko

TABLO VE ŞEKİLLER LİSTESİ

Tablo 4.1.MDA değerlerinin gruplar ve günlere göre istatistiksel önem kontrolü..... 46

Tablo 4.2.SOD değerlerinin gruplar ve günlere göre istatistiksel önem kontrolü.....48

Tablo 4.3.CAT değerlerinin gruplar ve günlere göre istatistiksel önem kontrolü 50

Tablo 4.4.GSH-Px değerlerinin gruplar ve günlere göre istatistiksel önem kontrolü..... 52

Tablo 4.5.NO değerlerinin gruplar ve günlere göre istatistiksel önem kontrolü.....54

Tablo 4.6.ELISA OD değerlerinin gruplar ve günlere göre istatistiksel önem kontrolü.....56

Şekil 4.1.1. MDA değerlerinin gruplar ve günler arası değişimi……..... 47

Şekil 4.1.2 MDA değerlerinin grup ve günlere göre Error-Bar grafiği..... 47

Şekil 4.2.1. SOD değerlerinin gruplar ve günler arası değişimi……..……... 49

Şekil 4.2.2. SOD değerlerinin grup ve günlere göre Error-Bar grafiği ……... 49

Şekil 4.3.1. CAT değerlerinin gruplar ve günler arası değişimi……..... 51

Şekil 4.3.2. CAT değerlerinin grup ve günlere göre Error-Bar grafiği……..... 51

Şekil 4.4.1. GSH-Px değerlerinin gruplar ve günler arası değişimi……..... 53

Şekil 4.4.2. GSH-Px değerlerinin grup ve günlere göre Error-Bar grafiği ……..….. 53

Şekil 4.5.1. NO ortalamalarının gruplar ve günler arası değişimi……..……..…….55

Şekil 4.5.2. NO değerlerinin grup ve günlere göre Error-Bar grafiği……...…… 55

Şekil 4.6.1. IgG ELISA OD ortalamalarının gruplar ve günler arası değişimi……..…..57

Şekil 4.6.2. IgG ELISA OD değerlerinin grup ve günlere göre Error-Bar grafiği……..... 57

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Corynebacterium pseudotuberculosis koyunlarda kazeöz lenfadenitis (KLA) hastalığın etkenidir (1, 2). Kazeöz lenfadenitis pek çok ülkede koyunculuk endüstrisinde önemli kayıplara neden olmaktadır. Deride oluşan apseler deri kalitesini ve yapağı verimini olumsuz etkilemekte, iç organlarda oluşan lezyonlar hayvanlarda veriminin azalmasına yol açmaktadır (3-5).

Hastalığın ilaçlarla etkin bir tedavisinin olmaması, etkenin doğa şartlarına dayanıklı olması, yetiştiricilerin hastalığın önemi ve kontrolü hakkında yeterli bilgiye sahip olmaması, subklinik hastaların tespitinin zorluğu, aşılamanın her yıl tekrar edilmesine yeterince önem verilmemesi hastalığın kontrol stratejilerinin başarısını ve sürdürülebilirliğini sınırlayan başlıca faktörlerdir. Hastalığın kontrol edilmesinde aşılamayla birlikte, klinik belirti gösteren hayvanların ve testlerle klinik belirti göstermeyen taşıyıcıların belirlenerek sürüden çıkarılması önemli bir kontrol stratejisidir (2, 3, 6-10).

Çalışmanın amacı, saha şartlarında, KLA'ya karşı bakterin ve toksoid kökenli bir monovalan aşıyla aşılanan kuzulara, aşılamayla birlikte tek doz deri altı E vitamini ve Se kombinasyonunun (100 IU E Vitamini + 1,03 mg Se) oksidatif cevap üzerindeki etkisini incelemektir. Bu amaçla malondialdehit (MDA), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve nitrik oksit (NO) ölçümleri yapıldı. Çalışmada ayrıca KLA aşılamasına karşı oluşan immunglobulin seviyeleri de ölçüldü. Çalışmada KLA, oksidatif cevap, Se ve E vitamininin oksidatif cevap üzerindeki etkileri hakkında genel bilgiler verildikten sonra, elde edilen bulgular ışığında çalışmanın sonuçları tartışıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KAZEÖZ LENFADENİT

2.1.1. ETİYOLOJİ

Kazeöz lenfadenitis *C. pseudotuberculosis* isimli bakterinin neden olduğu, lenf düğümleri ve iç organlarda apse oluşumuyla karakterize koyun ve keçilerin bulaşıcı bir hastalığıdır (1, 2). *C. pseudotuberculosis* etkeninin sığırlarda ülseratif lenfangitise (11, 12) atlarda ülseratif lenfangitis, pektoral apse, folikülitis ve frunkloza (13), manda (14), lama ve alpakalarda (15) çeşitli lezyonlara yol açtığı bildirilmiştir. Etkenin insanlarda aksiler ve inguinal lenfadenitise neden olduğu çeşitli vakalar da kaydedilmiştir (16).

Kazeöz lenfadenitis koyunculuk endüstrisinde önemli kayıplara neden olmaktadır. Deride oluşan apselerin deri kalitesini ve yapağı verimini olumsuz etkilediği, iç organlarda oluşan yangıların zayıflamaya dolayısıyla veriminin azalmasına yol açtığı bildirilmiştir (4, 5). KLA enfeksiyonunda fertilitenin azaldığı hatta bazı koyunlarda yavru atmanın da görüldüğü bildirilmiştir (17).

2.1.1.1. Sınıflandırma

C. pseudotuberculosis; *Mycobacterium*, *Nocardia* ve *Rhodococcus* (CMN) türlerini içeren *Actinomycetes* grubuna dahildir. CMN türleri *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* ve *M. leprae* gibi insanlar ve hayvanlarda önemli hastalıklara yol açan bakterileri de kapsamaktadır (18-20). Bu gruptaki bakterilerin ortak özellikleri hücre duvarında fazla miktarda peptidoglikan, arabinoglikan ve mikolik asit içeren büyük polimer zincirleri bulunmasıdır (21-23).

2.1.1.2. Mikrobiyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

C. pseudotuberculosis, gram-pozitif, fakültatif, anaerob bir bakteri olup mikroskopta genellikle tek, çomak, mekik veya oval şekilde görülür. Bakterinin spor oluşturmadığı, kapsülsüz ve hareketsiz olduğu ve en iyi 37°C sıcaklıkta ve 7,0-7,2 pH değerlerinin sağlandığı şartlarda ürediği bildirilmiştir (18, 19, 21-25).

Bakteri genetik olarak, koyun ve keçileri enfekte eden nitrat-negatif biyotip (19, 26, 27) ve atları enfekte eden nitrat pozitif biyotip (28, 29) olmak üzere iki alt biyotipe ayrılmaktadır. Koyun ve keçileri etkileyen biyotipin atları etkilemediği tespit edilmiştir. Diğer taraftan, atlardan alınan suşlar keçilere enjekte edildiğinde, enjeksiyon alanında apse oluşumu, lenf yumrularında akıntı tespit edilmiş, ancak iç organlarda lezyon tespit edilmemiştir (29). Bakteri, kanlı triptoz besi yerinde 37°C sıcaklıkta, 48 saat inkübasyondan sonra, yavaş büyüme gösteren, açık krem rengi ve etrafında ince bir β-hemoliz alanı bulunan bir koloni oluşturur. Meydana gelen koloniler granüler, opak, mat yüzeyli ve besi yerine yapışmayan özelliktedir (23, 25).

Koyun ve keçilerden elde edilen izolatlar arasında antijenik veya biyokimyasal bir fark bulunmadığı, izolatlar arasında salgılanan toksin tipleri ve miktarları açısından ise farklılıklar söz konusu olduğu bildirilmiştir (1). *C. pseudotuberculosis* suşları bakterinin virülensliğinde önemli rol oynayan fosfolipaz D (FLD) egzotoksinini salgılamaktadır (30, 31). *C. pseudotuberculosis*'in katalaz pozitif, oksidaz negatif ve beta-hemolitik özellikte olduğu bildirilmiştir (19, 24, 31).

2.1.1.3. Antimikrobiyel Maddelere Duyarlılık

C. pseudotuberculosis suşlarının antimikrobiyel maddelere duyarlılıkları farklılık göstermektedir. Muckle ve Gyles (31), keçilerdeki KLA lezyonlarından izole ettikleri 26 suşun tamamının ampisilin, kloramfenikol, linkomisin, gentamisin, tetrasiklin, penisilin G ve sulfametoksazol-trimetoprim antibiyotiklerine karşı *in vitro* olarak hassas olduklarını bildirmişlerdir. Bunlardan üç türün, neomisine karşı duyarlı olduğu belirlenirken, bütün türlerin streptomisine dirençli olduğu belirlenmiştir. Garg ve ark. (32), penisiline son derece dirençli, ancak neomisine duyarlı *C. pseudotuberculosis* suşları tespit etmişlerdir. *C. pseudotuberculosis* üzerinde 39 farklı antimikrobiyel ajanın *in vitro* etkinliklerinin incelendiği başka bir çalışmada suşların çoğunun, penislin, makrolit, tetrasiklin, sefalosporin, linkomisin, kloramfenikol ve rifampisine duyarlı oldukları, çoğu izolatın ise aminoglikozitlere, nitrofuranlara, polimiksin, nalidiksik asit

ve sikloheksimide karşı dirençli oldukları tespit edilmiştir (33). Amikasin açısından değerlendirildiğinde, koyun ve keçilerden elde edilen izolatların at ve sığırdan elde edilen izolatlardan daha yüksek minimum inhibe edici konsantrasyona sahip olduğu bildirilmiştir (34).

2.1.1.4. Virülenslik Faktörleri

2.1.1.4.1. Fosfolipaz D Egzotoksini

Fosfolipaz D, *C. pseudotuberculosis* tarafından salgılanan, bakterinin virülensliğinde önemli bir rol oynayan ekzotoksindir (1, 2, 35, 36). FLD geni mutasyona uğratılan C. *pseudotuberculosis* suşunun virülensliğinde azalma meydana geldiği bildirilmiştir (36). Hodgson ve ark. (35), FLD toksin geni silinen *C. pseudotuberculosis* suşundan hazırlanan aşının etkili bir koruma meydana getirdiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bu sonuca dayanarak FLD antijeni dışında başka antijenlerin de bağışıklıkta önemli rol oynadıklarını ileri sürmüşlerdir.

2.1.1.4.2. Hücre Duvarı Lipidleri

C. *pseudotuberculosis* bakterisinin hücre duvarında bulunan korinomikolik asit isimli lipidin *M. tuberculosis* hücre duvarındaki mikolik asitlerin benzeri olduğu, bu lipidin bakteri virülensliğinde önemli bir rol oynadığı, bakteriyi enzim ve lizozomlardan koruduğu, makrofajların içinde canlı kalmasını sağladığı ve bu şekilde hastalığın kronikleşmesinde rol aldığı tespit edilmiştir (18-20, 37).Bakteri hücre duvarındaki bu toksik lipidin immunojen özelliklerinin olmadığı ve daha çok piyojen özellikte olduğu bildirilmiştir (37). *C. pseudotuberculosis*'in lipid içeriği fazla olan suşlarının fareye inokülasyonu sonucu daha fazla apse oluştuğu gözlenmiştir (38). Bakterideki bu lipid tabakanın fagositozdaki proteolitik enzimlere karşı koruma sağladığı da bildirilmiştir (38).

2.1.1.4.3. *F*ag A, B, C ve D Genleri

Bakterinin virülensliğinde rol onayan başlıca iki antijen FLD ve toksik hücre zarı lipidlerine ilaveten, son zamanlarda bakterinin demir tutma metabolizmasında görev alan *F*ag A, B, C ve D genlerinin de virülenslikte önemli rol oynadığı tespit edilmiştir. *F*ag B mutasyona uğratıldığında demir kullanımının değişmediği, ancak, bakterinin yaşama ve apse oluşturma özelliklerinde azalma meydana getirdiği bildirilmiştir (39).

2.1.2. EPİDEMİYOLOJİ

2.1.2.1. Doğada ve Konakçıda Canlı Kalabilme

Pek çok stres şartlarına karşı dayanıklı olan *C. pseudotuberculosis*'in, ahır şartlarında günlerce, daha düşük ısılarda aylarca canlı kaldığı, organik olarak zengin toprakta da yaşayabildiği, ancak böyle topraklarda çoğalıp çoğalmadığının bilinmediği ifade edilmiştir (9). Etkenin oda sıcaklığındaki yaş gübrede 10 gün (40), daha düşük sıcaklık koşullarında ahır zeminindeki kuru ot gibi altlık materyalinde birkaç ay hatta bir yıldan daha uzun süre canlı kalabildiği bildirilmiştir (9). Etkenin banyo suyunda 24 saat canlı kalabildiği belirtilmiştir (41). Etkenin, besi yerinde, 37°C sıcaklıkta 27 saat, 22°C sıcaklıkta 72 saat ve 4°C'de yaklaşık 10 saat canlı kalabildiği bildirilmiştir (9, 42). Sutherland ve ark. (43), apselerden aldıkları örnekleri 14 gün süre ile -20°C ısıda muhafaza etmiş, daha sonra çözdürdükleri bu apse örneklerini, koyunların omuz ve göğüs bölgelerinde oluşturulan yaralara 2 gr miktarında sürmüşlerdir. Dondurulmuş ve çözdürülmüş bu irin örneklerinin taze irin ile aynı şiddette enfeksiyon oluşturduğunu tespit etmişlerdir.

Etken, konakçı hücrede fagosite olduktan sonra, konakçı hücrelerinin, reaktif oksijen ve nitrojen türevleri ile bakteri üzerinde antimikrobiyel etki meydana getirmeye çalıştığı bildirilmiştir. Ancak bu saldırının, bakterideki bu tür antimikrobiyel etkilere karşı koruma mekanizmalarını harekete geçiren genlerin regülâsyonunu aktive ettiği, bu genlerin regülasyonu neticesinde oluşturulan anti-stres cevapla, bakterinin hücre içinde fagositoz mekanizmasından korunarak canlı kalmayı başardığı ve intraselüler parazit haline geldiği belirtilmiştir (44).

2.1.2.2. Yetiştirme ve Irk

Hastalığın epidemiyolojisinin ekstansif ve entansif üretim sistemine göre değişebildiği ifade edilmiştir. Ekstansif üretim siteminde KLA'nın erginlerde yaygın ve kuzularda daha az gözüktüğü; entansif üretim sisteminde kuzularda ve erginlerde daha hafif seyrederken, erişkinlerde kronikleşme eğilimi gösterdiği bildirilmiştir (45). Avustralya'da merinoslarda diğer ırklara göre hastalığın daha yüksek seyrettiği bildirilmiştir (6, 45). Ancak, Pépin (46), Fransa'da bazı sütçü ırklarda hastalığın prevalansının daha yüksek olduğunu bildirmiştir.

2.1.2.3 Konakçıda Yayılma ve Bulaşma

Hastalığın bulaşmasında, bronşiyal apselerden ve yüzeysel patlamış yüzeysel lenf yumrusu apselerinin, otlakları, barınak ve yetiştirme araçlarını kontamine etmesinin önemli rol oynadığı bildirilmiştir (47, 48). Akciğerlerde oluşan apselerin, burun ve salya akıntılarına drene olmasının da önemli bir bulaşma yolu olduğu belirtilmiştir (48, 49). Akciğer apsesi bulunan koyunların nefes borusundan yapılan ekimler sonucunda akciğerde bulunan apselerin trakeye boşaldığı gösterilmiştir (49). Japonya'da KLA ile ilgili yapılan bir çalışmada, kırkımdan sonra deride oluşan kesik ve sıyrıkların hastalığın bulaşmasında önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir (50). Bazı çalışmalarda (6, 51), kırkım sonrası bakım koşullarının da KLA prevalansı üzerinde önemli etkisi olduğu bildirilmiştir.

2.1.2.4. Prevalans

Avustralya'da yapılan prevalans çalışmasında hastalığın ortalama prevalansının % 26 olduğu tespit edilmiştir (51). Avustralya'da 1987-88 yıllarında KLA tarafından, yün kaybı ve kesim esnasındaki imhalardan dolayı meydana gelen maddi kaybın 25 milyon dolar olduğu bildirilmiştir (6). Batı Amerika'da yapılan bir çalışmada koyunlarda KLA prevalansının % 42,4 olduğu bildirilmiştir (5). Tebriz'de yapılan bir çalışmada KLA sıklığı bakteriyolojik incelemeye göre % 12,60, histopatolojiye göre % 20,08 olarak tespit edilmiştir (52).

Türkiye'de hastalığın, ülke, bölgeler ve ırklar bazındaki epidemiyolojik durumu hakkında yeterli çalışma bulunmamaktadır. Ülkemizde işletmelerin çoğunun küçük ölçekli aile yetiştiriciliği şeklinde olması, hayvan hareketlerinin yoğunluğu, bu hastalık hakkında yetiştiricilerin biyogüvenlik ve koruma yöntemlerini tam olarak bilmemeleri, hastalığın yayılmasında önemli faktörler arasındadır. Çetinkaya ve ark, (53) Elazığ yöresinde, Et ve Balık Kurumunda kesilen koyunlarda preskapular lenf yumrusu apseleri üzerinde yaptıkları çalışmada, mezbahada kesilen 2046 baş koyunun 89'unda, 2262 keçinin ise 29'unda apse tespit edildiği bildirmişlerdir. Mezbahada kesilen hayvanların preskapular lenf yumrusunda tespit edilen bu apselerin % 84'ünün *C. pseudotuberculosis* kaynaklı olduğu belirlenmiştir.

2.1.3. PATOGENEZ

Koyunlarda KLA primer yara enfeksiyonu şeklinde başlar, bu yaradan FLD toksini yardımıyla lenf sistemine ve kan dolaşımına dahil olarak, lenf yumrularında ve çeşitli iç organlarda sekonder enfeksiyon meydana gelmesine yol açar. Bu aşamada hastalık ya durdurulur, ya da konakçıya iyice yerleşir ve karakteristik KLA lezyonları meydana gelir (1). Etken konakçıya girdikten sonra güçlü bir lokal reaksiyon başlatarak 1-4 gün içerisinde nötrofillerin inokülasyon bölgesine göçüne neden olur. Bakteri, inokülasyon bölgesine göç eden makrofajlar tarafından fagosite edilir ve makrofajlar içinde lenf düğümlerine taşınır. Lenf düğümlerinde, 5-10 gün içerisinde piyogranülom tarzında mikro lezyonlar oluşur. Daha sonraki aşamada oluşan piyogranülomlar olgunlaşır ve hastalık persiste hale gelir (54-57). Bakterinin, makrofajlarda apoptozis veya otofaji süreçlerini tetiklememesine rağmen, makrofajların ölümüne nasıl yol açtığı aydınlatılamamıştır (58). Bakterinin, makrofajların içerisinde, bakteriyel hücre zarı lipidlerinin özelliği ve bakteriye ait bazı antijenik elemanların makrofajların nitrik oksit üretimini engellemesi yoluyla canlı kaldığı ifade edilmiştir (59).

Hücre duvarı lipidlerinin ve FLD'nin, KLA'nın patogenezinde önemli rol oynadığı belirtilmiştir (1, 60). FLD egzotoksini bakterinin konakçı hücreye girmesinde, konakçı hücrede hasar oluşturulmasında, konakçı bağışıklık sisteminin mekanizmalarının bozulmasında görev aldığı belirtilmiştir (6, 20, 61, 62). *C. pseudotuberculosis* tarafından salgılanan FLD'nin lenf damarları endotel hücrelerinde sfingomyelinin erimesine neden olduğu, bakterinin böylelikle geçirgen hale gelen lenf damarlarından lenf sistemine daha rahat geçtiği ifade edilmiştir (52). Etkenle enfekte olan lenf yumrularının % 60-80'inde apse meydana geldiği ve etkenin hücre duvarında yüksek miktarda lipid bulunmasından dolayı bağışıklık sistemin fagositik etkilerine karşı dayandığı bildirilmiştir (62). Ayrıca, FLD ve sitotoksik hücre duvarı lipidlerinin makrofajların ölümüne neden olduğu ve bu şekilde kronik enfeksiyonun oluşmasında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (38, 63). Farelerde bakterinin hücre zarı lipid oranıyla apse oluşumu arasında doğrudan bir bağlantı tespit edilmiş, diğer taraftan lipid içeriği ile ölüm oranı arasında doğrudan bir bağ kurulamamıştır (38).

Fosfolipaz D egzotoksini, endotel hücrelerinin geçirgenliklerinin artmasına, bu yolla etkenin deri katmanlarından kan damarlarına geçmesine ve sonuçta lenf damarlarına ulaşmalarına yardımcı olur (1, 20, 30, 64, 65). Derideki yaralar ve mukozadan girdikten

sonra makrofajlar tarafından fagosite edilen bakteriler lenf yumrularına taşınır; fagozomlar lizozomlarla birleşir, ancak fagolizozom içerisindeki yıkıcı etkilerden korunan bakteri bu fagolizozomlar içerinde çoğalmaya devam eder, oluşan fagolizozomlar çabucak parçalanır ve bakteriler serbest kalır. Başta makrofaj dejenerasyonu şekillenir ve bunun sonucunda nekrotik lezyon oluşur (1, 6, 18, 55). Konakçı bu reaksiyona etrafı güçlü bir kapsülle çevrili piyogranülomatöz apse oluşturarak cevap verir (55, 56). Lezyonların büyüklüğü ve şiddeti konağa giren bakteri sayısına, virülensliğine, çoğalma kabiliyetine ve konağın etkene karşı savunma mekanizmalarına bağlıdır (1).

At orijinli dört farklı *C. pseudotuberculosis* suşunun (yavaş ve hızlı büyüyen suşlar) farelerdeki etkilerin incelenmesini amaçlayan bir çalışmada karaciğer, dalak, akciğer ve mezenterik lenf yumrularına karşı yerleşme isteğinin her suş için farklı olduğu gösterilmiştir. Çok hızlı gelişim gösteren suşların karaciğer dokusunda fokal yerleşimli, kapsülsüz, akut ve yoğun hepatosit koagülasyon nekrozlarıyla karakterize lezyonlar meydana getirdiği bildirilmiştir. Bu lezyon alanlarında mononükleer ve polimorf yangı hücrelerinin birikimiyle karakterize hepatitis oluşumu gözlenmiştir. Aksine, yavaş gelişim gösteren suşlarla inoküle edilen farelerin karaciğerinde, çoklu, rastgele dağılım gösteren, birbirinden ayrı yerleşimli hepatoselüler nekroz odakları tespit edilmiştir. Hızlı gelişen suşlarla inoküle edilen farelerin karaciğerindeki nötrofilik hepatitisin, yavaş gelişim gösteren suşlarla inoküle edilen farelerdekine göre daha şiddetli seyir gösterdiği belirlenmiştir (66).

2.1.4. SEMPTOMLAR

Koyunlarda KLA lezyonları ilerleyici ve kronik özellikte olup, büyük ve çok sayıda değilse veya organın normal fonksiyonunu engellemiyorsa açık bir belirtiye neden olmamaktadır. Normal görünümlü hayvanlarda organlarda yerleşmiş çeşitli büyüklüklerde ve yapıda apseler mevcut olabilir. Apseler akciğerde lokalize olduğunda hayvanda hırıltı ve öksürük görülebilir. İç organlarda apse sayısı fazla olduğunda, hayvanlarda literatürde 'thin ewe syndrome' olarak adlandırılan, sürekli bir zayıflamanın görülebildiği bildirilmiştir. Yüzeysel olarak koyunlarda en çok preskapular ve mandibular lenf yumrularının etkilendiği bildirilmiştir (6, 68, 69). Hastalığın başlangıcında lenf yumruları büyür, yumuşak veya hamur kıvamındadır, bu lenf yumruları üzerindeki tüyler dökülmüş olabilir, apselerin üzerinde krem rengi veya

açık yeşil renkli irin sızan drenaj fistülü mevcut olabilir. Apse genelde bir kapsül içinde bulunur, bu kapsül zamanla nekroze olur ve tekrar gelişir; birbirini takip eden bu süreçte apse katmanlı bir hal alabilir ve mineralize olabilir (69, 70).

İç organlardan mediastinal lenf yumruları, akciğer ve karaciğer en fazla tutulan organlardır (6). Mediastinumdaki büyük apseler yemek borusuna baskı yaparak fonksiyon bozukluğuna yol açabilir. KLA, bazen karaciğer, dalak, böbrek, beyin, kalp, göz, diyafram, omurilik, meme kemik ve eklemlerde apselere neden olabilir (6, 69, 70). Bazı koyunlarda KLA hastalığının, yavru atmalara, ölü doğum ve neonatal enfeksiyonlara yol açtığı bildirilmiştir (17).

Amerika'da kesimhanelerde yapılan bir çalışmada apse lezyonların yerleştiği bölgeye göre dağılımının; bronşiyal lenf yumrusunda % 89, mediastinal lenf yumrusunda % 81, akciğerde % 76, preskapular lenf yumrusunda % 24, prefemoral lenf yumrusunda % 15, hepatik lenf yumrularında % 14, karaciğerde % 12, yüzeysel inguinal-meme lenf yumrularında % 9, böbrekte % 5, kastre skrotumda % 8, dalak ve kas % 4, popliteal lenf yumrusunda % 2 olduğu bildirilmiştir (71). Keçilerde akciğer apselerinin koyunlara göre daha az, deri altı lenf yumruları apselerinin ise daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (6, 67, 72, 73). Zaitoun ve ark. (74), 1107 baş koyunu kazeöz lenfadenitis açısından muayene etmişler ve hayvanların % 30,17'sinin enfeksiyona özgü klinik semptomlar gösterdiğini tespit etmişlerdir. Söz konusu çalışmada apselerin en çok % 61,53 oranında superfisial servikal ve % 50,89 oranında subiliak lenf düğümlerinde yerleştiğini, en az ise % 5,24 oranında paratoid ve retrofarengeyal lenf düğümlerinde yerleştiklerini saptamışlardır.

2.1.5. LABORATUVAR BULGULARI

2.1.5.1. Patoloji ve Histopatoloji

Hastalanan hayvanlarda apseler genelde preskapular, popliteal, bronşiyal, mandibular ve mediastinal lenf yumrularında yerleşmekte, bazen iç organların parenşim dokuzunda da görülmektedir (70, 75). Klinik incelemede kazeöz lenfadenitis tanısı konan 115 koyunun kesimini takiben yapılan incelemede 72 (% 62,6) olguda hastalığın yüzeysel lenf yumrularında, 22 (% 19,13) adet olguda viseral formda lokalize oldukları, 21 olguda (% 18,26) ise hem yüzeysel hem de viseral formda lokalize oldukları tespit edilmiştir (70). Bu hayvanlarda apselerin, çoğunlukla mandibular ve preskapular, daha az oranda ise retrofarengiyal, parotid, femoral ve retrofarengiyal lenf yumrularında

yerleştiği tespit edilmiştir. Söz konusu araştırmada 39 hayvanda apselerin göğüs boşluğunda (akciğer dokusu ve/veya lenf yumruları), 7 hayvanda ise karın boşluğunda (karaciğer ve/veya lenf yumruları) lokalize olduğu tespit edilmiştir (70). Unanian ve ark. (76), etkilenen hayvanlarda apselerin % 41,6'sının yüzeysel lenf yumrularında tespit edildiğini bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada apseler hayvanların % 49,3 oranda baş bölgesinde, % 46,7 vücut bölgesinde ve % 12,3 oranda iç organlarda tespit edilmiştir (72). Stoops ve ark. (75), lezyonların toraks bölgesinde daha çok akciğer parenşiminde, mediastinal ve bronşiyal lenf yumrularında yerleştiğini, akciğer ve böbreklerin en fazla etkilenen iç organlar olduğunu bildirmiştir.

Histopatolojik bakımdan her apsenin bir içerik ve kapsülden oluştuğu ifade edilmiş olup, içeriğin özelliğine göre yumuşak içerikli ve lamelli apseler olarak 2 gruba ayrılmıştır. Hastalıkta koyun ve keçilerde enfeksiyonun başlangıcında lenf yumrularında mikro apseler oluşur, bu apselere yoğun nötrofil ve az miktarda eozinofil infiltrasyonu göçü meydana gelir. Lezyon alanında nötrofil, makrofaj, epitel hücreleri ve lenfositlerden oluşan yangı reaksiyonu gelişir, daha sonra lezyonun etrafı, epitel hücrelerin, makrofaj, lenfosit ve nötrofillerin infiltre olduğu fibröz bir bağ doku ile çevrilir (70). Kapsül zamanla nekroze olur, yeniden yapılanır, art arda gelişen bu lezyon, distrofik mineralizasyona uğrar ve lamelli bir apse yapısı oluşur (70, 77). Nekrotik odağın merkezinde hücre enkazı ve canlı *C. pseudotuberculosis* bakterileri bulunur (77). Akciğerde apse etrafındaki parenşim dokusuna baskı yapar, yangı hücreleri infiltre olur ve farklı derecelerde pnömöni gelişir (6, 70, 78). Bronşlarda ve peribronşiyal lenf yumrularında apse şeklinde lezyonlar, fibröz ve bronşiyal epitel hücrelerinde hiperplazi gelişir. Kollojen kapsülle çevrili bu piyogranülomlar yavaş yavaş gelişerek hayvanlarda herhangi bir bulgu oluşturmadan 10 cm çapından fazla büyüyebilir (78).

2.1.5.2. Mikrobiyoloji

Etkilenen lenf yumrularından alınan örneklerde *C. pseudotuberculosis* ile birlikte genelde *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *E. coli*, *Micrococcus* (70) suşları da izole edilmiştir. İzgür ve ark. (42), apselerden aldıkları materyalden yapıkları kültürlerde temel olarak 35 farklı *C. pseudotuberculosis* ile birlikte *Micrococcus*, *Staphylococcus aureus, Streptococcus epidermidis* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi patojenleri de izole ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar suşlar arasında egzotoksin oluşturma, beyaz

farelerde ölüm oranı ve hemolitik aktivite açısından farklılıklar olduğunu tespit etmişlerdir. Erganiş ve ark. (79), kronik apseli 100 koyunun 16'sından (% 16), Muz ve ark. (80) ise Elazığ Et ve Balık Kurumu Mezbahasında kesilen koyunların preskapular lenf yumrularından aldıkları 55 numunenin 35'inden (% 63,3) *C. pseudotuberculosis* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Ayers (67), klinik olarak hastalık belirtilerini gösteren koyun ve keçilerden aldığı 44 örneğin 31'inde *C. pseudotuberculosis* saptarken 13'ünde patojen olmayan bakterileri izole etmiştir.

İzgür ve ark. (42), apselerden aldıkları numunelerde en çok izole edilen organizmaların C. *pseudotuberculosis* (% 46,3) ve *Micrococcus* (% 19,5) olduğunu, bu iki bakterinin birlikte hastalığın etiyolojisinde önemli rol oynadığını bildirmişlerdir.

2.1.5.3. Biyokimya

Etkilenen hayvanlarda kan parametrelerinde genelde spesifik bir biyokimyasal değişiklik tespit edilememiştir (69). Eckersal ve ark. (81), yaptıkları deneysel çalışmada haptoglobulin, serum amiloid A (SAA) ve glikoprotein miktarının yükseldiğini tespit etmişlerdir. Hastalıkta lipid peroksidasyon parametreleri, kan pıhtılaşma faktörleri, karaciğer enzim değerleri veya diğer biyokimyasal parametrelerle ilgili yeterince kaynak bulunmamıştır. Uysal ve ark. (82), sağlıklı kuzular ve psöydotuberkülozlu kuzularda serum sodyum, potasyum, karbondioksit, glikoz, kan üre nitrojeni (BUN), kreatinin, ürik asit, kalsiyum, fosfor, alkalen fosfotaz, laktat dehidrojenaz (LDH), serum glutamik oksaloasetik transaminaz (SGOT), serum glutamik pirüvik transaminaz (SGPT), gamma-glutamil transferaz (γ-GT), kolesterol ve trigliserit değerleri arasında bir fark olup olmadığını inceledikleri çalışmalarında karbondioksit ve fosfor açısından farkın $P<0.01$, ürik asit değerleri açısından $P<0.001$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulmuşlardır. Aynı çalışmada sodyum, potasyum, glikoz, BUN, kreatinin, kalsiyum, alkalen fosfotaz, LDH SGOT, SGPT, γ-GT, kolesterol ve trigliserit değerlerinin normal kuzular ve KLA ile enfekte kuzularda normal fizyolojik sınırlar içerisinde olduklarını tespit etmişlerdir.

2.1.6. TEŞHİS

2.1.6.1. Anamnez ve Klinik Bulgular

Hastalığın teşhisi anamnez ve klinik bulgulara göre konulur. İç organlarda önemli bir tutulum yoksa etkilenen hayvanlar genelde hareketli, iştahı yerinde ve normal

görünümde olup ateş bulunmaz. Mevcut apseler başta serttir ve olgunlaştıkça yumuşar; koyunların apselerinde soğan katmanlarına benzer tabaka oluşumu mevcuttur, ancak bu durum keçilerde görülmez (69).

2.1.6.2. Mikrobiyoloji

Kesin teşhis için bakteriyel kültür yapılması en önemli yöntemdir. Mikrobiyolojik kültür için numuneler apsenin kenarından alınmalıdır, apse ortasından alınan bazı numunelerde büyüme görülmeyebildiği bildirilmiştir (6). Bakteri, kanlı triptoz besi yerinde 37°C sıcaklıkta, 48 saat inkübasyondan sonra, yavaş büyüme gösteren, açık krem rengi ve etrafında ince bir β-hemoliz alanı bulunan bir koloni oluşturur. Meydana gelen koloniler granüler, opak, mat yüzeyli, krem-turuncu renkte ve besi yerine yapışmayan özelliktedir (21, 23-25).

2.1.6.3. Diğer Laboratuvar ve Tarama Testleri

Yetişkin taşıyıcı hayvanlar ile etkenin belirgin bir antikor reaksiyonuna yol açmadığı genç hayvanlarda, pozitif seroloji testlerinin yorumlanmasının oldukça güç olduğu bildirilmiştir. Yorumlamada diğer bir güçlük ise daha önce etkenle karşılaşmış ancak etkenin üstesinden gelmiş hayvanlarda persiste antikorların mevcudiyetidir (6). Kumar ve ark. (83), hastalığın insidensi ölçmek için seroloji yöntemini, klinik teşhis ve kültür yöntemleriyle birlikte kullanmıştır. Atlarda, bazen büyük apseler bulunan hayvanlarda serolojik titre çok düşük veya sıfır çıkabilmiştir (84). Ayrıca bu testlerin çoğunun bireysel düzeyde spesifikliği ve hassaslığı, etken enfeksiyon başlangıcından hemen sonra intraselüler hale geçtiğinden göreceli olarak düşüktür (6, 69, 85-87). *M. pseudotuberculosis* ile çapraz reaksiyonlar sonucunda da hatalı pozitif sonuçların meydana gelebileceği bildirilmiştir (6, 57, 88). Seroloji testlerinin dezavantajlarına rağmen hastalıkla mücadelede, belirti göstermeyen taşıyıcıların sürüden uzaklaştırılmasında seroloji testlerinin önemli bir yerinin olduğu ifade edilmiştir (85, 86). Stanford ve ark. (89), ve Paton ve ark. (3) tarafından yapılan aşılama çalışmalarında aşıyla meydana gelen korumayı ölçmede serolojinin hatalı yorumlamalara neden olabileceğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar, bu durumun *C. pseudotuberculosis* etkenine karşı konağın verdiği bağışıklık cevabın karmaşıklığına bağlı olduğunu, bu nedenle sadece tek bir tip bağışıklık cevabın ele alınarak koruma seviyesinin değerlendirilmesinin doğru olmayacağını ileri sürmüşlerdir.

Hastalığın tespit edilmesinde, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) (83, 90), antihemoliz inhibisyon (91), indirekt hemaglütinasyon (92), hemoliz inhibisyon (93), immundifüzyon (94) ve enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) testi kullanılmıştır (6, 49).

2.1.6.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Çetinkaya ve ark. (90), apselerden aldıkları materyalde, PZR yöntemiyle apselerin % 84'ünden *C. pseudotuberculosis* etkenini izole etmiş, bu bulgulara dayanarak, insan ve sığırlardaki *Corynebacterium ulcerans* ile çapraz pozitif reaksiyon verebilmesine rağmen, testin hızlı ve spesifik oluşundan dolayı geleneksel yöntemlere ek olarak PZR testinin, koyun ve keçilerde KLA'nın tespit edilmesinde kullanılabilecek alternatif bir yöntem olduğunu bildirmiştir. Kumar ve ark. (83), apselerden aldıkları irin örneklerinden PZR ile etkenin izole edilmesi üzerinde çalışmış, PZR yönteminin hızlı, spesifik ve mikrobiyolojik kültür yöntemine benzer şekilde güvenilirliği yüksek sonuçlar verdiğini, dolayısıyla KLA'nın teşhisinde ve kontrol edilmesinde teşhiste yardımcı bir test olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

2.1.6.3.2. ELISA testi

Hastalığın taranmasında yaygın olarak kullanılan ELISA prensip olarak etkenin virülenslik faktörlerinden FLD toksini ve hücre duvarı antijenlerine karşı oluşan antikorların tespitine dayanır. Paton (6), koyunlarda *C. pseudotuberculosis* tespitine yönelik olarak hüre duvarı-ELISA (C-ELISA) ve toksin-ELISA (T-ELISA) testlerini kullanmıştır. Paton (6), doğal olarak enfekte olan ve enfekte olamayan gruplarda C-ELISA ile T-ELISA'nın hassaslığını ve spesifikliğini karşılaştırmış, C-ELISA için sensitiviteyi % 76 spesifikliği % 73, T-ELISA için ise sensitiviteyi % 67 ve spesifikliği % 77 olarak bulmuştur. Aynı çalışmada doğal olarak enfekte 115 koyundan 71'inde KLA lezyonları olmasına rağmen, 71 koyundan 18'inde C-ELISA ve T-ELISA sonucu negatif çıkmış, ancak bu 71 koyuna ait lezyonlarından alınan numune ile yapılan ekimde *C. pseudotuberculosis* tespit edilmiştir. C-ELISA ile T-ELISA'ya göre daha fazla KLA lezyonlu koyun tespit edilmiş, diğer taraftan T-ELISA doğal olarak enfekte koyunlarda daha spesifik sonuç vermiştir (6). Her iki ELISA testinde spesifiklik ve sensitivite açısından bulunan sonuçlar anti-hemoliz inhibisyon testi (91) ve bakteriyel egzotoksin antikor jel difüzyon testi (49) ile bulunan sonuçlara benzerlik göstermiştir. Ancak akciğer lezyonu bulunan psöydotüberkülozlu koyunların tespitinde, C-ELISA ve

T-ELISA'nın diğer testlere göre daha spesifik olduğu bildirilmiştir. Bunun nedeninin kullanılan toksoid kökenli aşıların ELISA ile tespit edilebilir antikor üretebilerek T-ELISA sonuçlarında karışıklığa neden olabileceği, C-ELISA ise bakterinin hücre duvarına karşı antikorları tespit etmesine dayandığından daha spesifik olduğu bildirilmiştir (6). Hollanda'da KLA'nın keçilerden eradikasyonu için ELISA'nın başarıyla kullanıldığı bildirilmiştir (85). İlhan ve ark. (95), koyun kan serumlarında KLA antikorlarını tespit etmek amacıyla egzotoksin ELISA, sonike ELISA ve dot-blot ELISA testlerini karşılaştırmışlardır. Aynı çalışmada, egzotoksin ELISA'nın, sonike ELISA ve dot-blot ELISA tekniklerinden daha güvenilir olduğu, KLA'nın teşhisinde sonike ve egzotoksin ELISA tekniklerinin birlikte kullanılması durumunda, testlerin spesifiklik ve sensitivitelerinin daha yüksek olduğu ortaya konmuştur. Bu bulgulara dayanarak ekonomik ve pratik olan bu ELISA tekniklerinin hastalığın teşhisinde ve kontrolünde rutin bir laboratuvar tarama testi olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

2.1.6.3.3. İnterferon- gamma Testi

Brezilya'da yeni enfekte olmuş keçilerde KLA için spesifik marker olarak kabul edilebilecek bir interferon-gamma (IFN-γ) ELISA testi geliştirildiği bildirilmiştir (96). Menzies ve ark. (88), INF-γ testinin, hücresel bağışıklığın tespit edilmesinde normal antikor-ELISA testlerine göre daha hassas olduğunu, testin yorumlanmasında aşılamanın ve enfeksiyondan sonra geçen zamanın bir etkisinin olmadığını vurgulamıştır. Deneysel olarak enfekte edilen keçilerde INF-γ testinin spesifikliği % 97,1 sensitivitesi % 89,2 olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada toksine yönelik hazırlanmış ELISA testinin spesifikliği % 97, sensitivitesi % 81 olarak tespit edilmiştir. Sunil ve ark. (97), ve Prescott ve ark. (98) tarafından, kanda *C. pseudotuberculosis*'e karşı oluşan IFN-γ tespitine dayanan bir test geliştirilmesi amaçlanmış, geliştirilen testin güvenirliğinin % 95,7 olduğu ve aşılamanın bu testin sonuçlarında bir karışıklığa neden olmadığı bildirilmiştir. Bu nedenle, testin hastalığın eradikasyonunda, belirti göstermeyen enfekte koyunların sürüden uzaklaştırılmasında başarıyla kullanılabileceğini bildirilmişlerdir.

2.1.6.3.4. Deri Alerji Testleri

Hastalığın başlarda klinik belirti göstermeden seyretmesi, ilk evrelerde antikorların seroloji ile tespit edilebilir düzeyde olmaması, benzer başka enfeksiyonların

mevcudiyetinde de pozitif sonuçların alınması, bazı araştırmacıları KLA'nın sahada erken teşhisinde kullanılabilecek deri alerji testleri üzerinde çalışma yapmaya yönlendirmiştir (99-101). Koyuncuoğlu (100), koyunlarda sahada pratik bir şekilde kullanılabilecek bir deri testi hazırlamıştır. Bu testin kullandığı bir çalışmada 13 koyundan 12'sini alerji deri testi ile KLA açısından pozitif bulunmuş, bu testin hastalığın erken teşhis edilmesinde, koyun sürülerinde hastalığın taranmasında ve hastaların sağlıklılardan ayrılmasında faydalı olacağı vurgulanmıştır. Alves ve Olander (102), *C. pseudotuberculosis*'e ait spesifik bakteriyel ajanlarıyla yapılan deri testinin keçilerde hastalığın tespit edilmesinde ve ilerleyişinin gözlenmesinde kullanışlı olduğunu bildirmiştir.

2.1.6.3.5. Biyokimya Testleri

Eckersal ve ark. (81), yaptıkları deneysel çalışmada haptoglobulin, serum amiloid A (SAA) ve glikoprotein gibi birden çok akut faz proteinin analiz edilmesinin teşhise yardımcı olabileceğini savunmuştur. Coryne-tipi bakterilerin tanımlanmasında API Coryne Sistem (API-bioMérieux, Inc., La Balme les Grottes, France) isimli biyokimyasal testin kullanışlı olduğu bildirilmiştir. Yirmi bir adet biyokimyasal test kullanılarak, 24/48 saatte yapılabilen bu test sisteminin diğer standart test sistemlerine göre daha güvenilir olduğu bildirilmiştir. Bu sistemde 11 adet enzimin test edilmesine (pirazinamidaz, pirolidonil arilamidaz, α-galaktozidaz, alkaline fosfataz, α-glikozidaz, *N*-asetilglikozaminidaz, β-glukuronidaz, nitrat redüksiyon ve jelatin, üre ve eskulin hidroliz) ve 8 adet karbonhidrat fermantasyon parametresinin (glikoz, riboz, D-ksiloz, manitol, maltoz, laktoz, sükroz ve glikojen) test edilmesine imkan tanıyan substratları içeren 20 adet tüp kullanıldığı belirtilmiştir. (21).

2.1.7 AYIRICI TANI

Koyun ve keçilerde pek çok bakteri apseye neden olabilmektedir. Bu hayvanlarda görülen apselerden *Fusobacterium necroforum*, *Manhemia hemolytica*, *Staphyloccocuss aureus* ve *Echerichia coli* gibi pek çok bakteri izole edilmiş olup, bu şekilde oluşan apselerin daha sulu bir içeriğe sahip ve kötü kokulu olup, genelde lenf yumrularını etkilemediği bildirilmiştir (69). Bazı kaynaklarda, koyun ve keçilerde KLA'nın, aktinobasilloz ve tüberküloz hastalıklarıyla, *Arcanobacterium pyogenes* ve *Pasteurella multocida* tarafından oluşturulan apselerle karıştırılabileceği bildirilmiştir (69, 84). Avrupa'nın bazı yerlerinde görülen Morel hastalığı KLA'ya benzemektedir, bu

hastalıkta etken *Staph. aureus* olup yüzeysel lenf yumrularında, deri altı dokularında ve kaslarda apselere neden olmaktadır. Hastalık daha çok gençlerde görüldüğü ve yaşlanmayla birlikte hastalığın kaybolduğu bildirilmiştir (6, 103). Sürüdeki kronik zayıflama paraziter sindirim sistemi hastalıkları ile; solunum yolu belirtileri bakteriyel pnömöniler, akciğer kurtları, koyunların pulmoner adenomatozisi ile karışabilir (69).

2.1.8. TEDAVİ

Hastalığın tedavisi için etkili bir yöntem bildirilmemiştir. Hayvanda apse bir kez görüldü mü, etkilenen hayvan hayatı boyunca hasta kabul edilmesi gerektiği ifade edilmiştir (69). Etken *in vitro* olarak penisilin, tetrasiklin, makrolid ve sefalosporinler dâhil pek çok antibiyotiğe duyarlı olmasına rağmen, bakterinin hücre içi oluşu, apse ve kapsül oluşumu etkin bir tedavinin önüne geçmektedir (31, 69). Damızlık değeri yüksek hayvanlarda meydana gelen apselerin cerrahi olarak açılıp temizlenmesi seçilse bile tekrar nüks olasılığı yüksektir (84). Apse bulunan hayvanların tedavi edilmesi ekonomik olarak uygun olmayıp hastalığın kontrolünde başarılı sonuç vermemektedir. Apseler açılmaya müsait değilse lipofilik ilaçlardan, makrolidlerden yüksek dozda uzun süre kullanılması nispeten etkili olabilir (84). Washburn ve ark. (104), KLA enfeksiyonlu koyunlarda üç farklı tedavi rejiminin etkinliğini karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada, A grubundaki deneklerin apseleri açılmış, drenaj yapılmış ve deri altı prokain penislin G uygulanmış; B grubundaki apselere kapalı sistem lavaj uygulanmış ve lezyon içine tulatromisin tatbik edilmiş; C grubundaki apselere kapalı sistem lavaj yapılmış ve hayvanlara deri altı tulatromisin uygulanmıştır. Bir ay sonra enfeksiyonun gerilemesi bakımından gruplar arasında kayda değer bir farkın olmadığı tespit edilmiştir.

2.1.9 BAĞIŞIKLIK

C. pseudotuberculosis'in hücre içi bir patojen olması ve bakteriye ait farklı antijenlerin virülenslikte rol oynamasının konakçıda gelişen bağışıklığın karmaşık bir yapıda olmasına neden olduğu, dolayısıyla bağışıklıkta hem humoral hem de hücresel bağışıklığın önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (78, 96).

2.1.9.1 Humoral Bağışıklık

Doğal olarak oluşan enfeksiyona karşı humoral bağışıklığın önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (49). Muramil dipeptidin adjuvan olarak kullanıldığı bakteri hücre duvarından üretilen aşıların etkili bir koruma sağladığı gösterilmiştir (105). Paule ve

ark. (96), keçilerde oluşturdukları deneysel primer enfeksiyonda, pozitif antikor titrelerinin ELISA ile 6-11. günlerde tespit edebilir düzeye ulaştığını bildirmişlerdir. Aynı yazarlar, immunglobulin G (IgG) üretiminin enfeksiyondan sonraki 16 ile 21. günlerde maksimum düzeyde seyrettiğini daha sonra düşme gösterdiğini tespit etmişlerdir. Antikorların antijenlere bağlanma isteği açısından dolaşımda bulunan antikor miktarıyla, KLA lezyonları arasında negatif bir korelasyon bulunmasının hastalığın patogenezinin zaman-ilerleme kinetikleriyle fazla bir bağlantısı olmadığı ve bunun daha çok bireylerin immuno-genetik yapılarına bağlı olabileceği bildirilmiştir (96, 106).

2.1.9.2 Hücresel Bağışıklık

Hastalığa karşı maksimum koruma için etkene karşı meydana gelen immunglobulinlerin yanında hücresel yapılara bağlı savunma sistemlerinin de önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (105). Hücresel bağışıklığın karmaşık etki mekanizmalarıyla ilgili bilgiler sınırlıdır. Walker ve ark. (77), KLA lezyonlarında nekrotik alanlarda, lenfositler aracılığıyla regüle edilen hücresel bağışıklık düzeyinde bir savunma oluşturulduğunu bildirmişlerdir. Aynı yazarlar, kalın kapsül içerisinde lezyona en yakın noktada antijen sunan hücreler olarak görev yapan makrofajlardan yoğun bir bant, bu bandın üzerinde makrofajları harekete geçiren INF-γ'yı üreten CD8 ve CD4-T lenfositlerinden zengin bir bant tespit edilmiştir. Araştırmacılar ayrıca, en dışta kapsül kollajenine yakın *C. pseudotuberculosis* tarafından üretilen FLD toksini ve sitotoksik hücre duvarı lipid antijenlerini nötralize eden antikorları üreten CD45R-B lenfosit hücrelerini içeren başka bir bant bulunduğunu da tespit etmişlerdir.

Farelerde yapılan bir çalışmada *C. pseudotuberculosis* enfeksiyonunda levamizol verilmesinin spesifik olmayan bağışıklığı uyardığı görülmüştür. Levamizol ile tedavi edilen farelerde hastalığın oluşturulmasından sonra IgG ve immunglobulin A (IgA) seviyelerinde artma meydana geldiği, bu sonuca göre *C. pseudotuberculosis* enfeksiyonuna dirençte hücresel bağışıklığın humoral bağışıklıktan daha önemli olabileceği kanısına varılmıştır (107).

Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada endojen tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-α) ve INF-γ'nın KLA enfeksiyonunda rolleri incelenmiş, TNF-α ve INF-γ seviyelerinin enfeksiyonun 4. gününde en yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir (108). Aynı çalışmada farelere anti-TNF-α monoklonal antikoru (mAb) ve anti-INF-γ mAb

uygulamasının organlarda bakterilerin üremesine ve farelerde ölümlere neden olduğu tespit edilmiştir. Anti-TNF-α mAb uygulamasının anti-INF-γ mAb uygulamasına göre, enfeksiyonun hayvanlarda daha fazla kötüleşmesine yol açtığı bildirilmiştir. Anti-TNF-α mAb ve anti-INF-γ mAb'ın birlikte uygulanmasının, organizmada etkene karşı gelişen antimikrobiyel savunma üzerinde tek tek uygulamadan daha fazla baskılayıcı bir etki meydana getirdiği, bu nedenle endojen kaynaklı TNF-α ve INF-γ konakçının *C. pseudotuberculosis* enfeksiyonuna direncinde önemli bir rol oynadığı ifade edilmiştir (108). Bu çalışmayla uyumlu olarak başka bir çalışmada CD4-Th1 hücrelerinin, TNF-α ve INF-γ salgılayarak enfeksiyona karşı direnç oluşumunda önemli rol oynadığı ifade edilmiştir (109).

Paule ve ark. (96), oluşturdukları deneysel enfeksiyonda, hayvanları, INF-γ üretim cevabına göre "enfeksiyona yüksek düzeyde cevap verenler" ve "düşük/orta düzeyde cevap verenler" olarak iki farklı gruba ayırmışlardır. Yazarlar, INF-γ üretiminin her iki grupta da kısa ömürlü bir primer cevap olarak enfeksiyondan sonraki 5. günde meydana geldiğini bildirmişlerdir. Düşük düzeyde INF-γ üretimi gerçekleşen grupta, 5. gün ile denemenin sonu olan 20. haftaya kadar INF-γ üretiminde daha fazla bir yükselme görülmediği ifade edilmiştir. INF-γ üretiminin enfeksiyona yüksek düzeyde tepki verenlerde 16. günde daha güçlü ve uzun ömürlü sekonder bir cevap olarak gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Ancak, INF-γ üretimi ile ilgili bu sonuçlarla hastalığın şiddeti arasında bir bağın kurulmasının güç olduğunu ifade etmişlerdir. Beşinci günde gerçekleşen kısa ömürlü primer INF-γ üretiminin daha çok doğuştan gelen savunmanın ilk aşaması olan T lenfositlerinin bir faaliyeti olduğu, uzun ömürlü ve sekonder INF-γ üretiminin daha sonra kazanılan bağışıklıkta rol oynayan T lenfositleri kaynaklı hücresel bağışıklığın bir cevabı olduğu ileri sürülmüştür.

Hastalığın erken dönemlerinde meydana gelen bağışıklıkla ilgili yapılan başka bir çalışmada (109), *C. pseudotuberculosis*'e karşı savunmada kompleman sisteminin rolü incelenmiştir. Yapılan deneylerde tip 3 kompleman reseptörünün (CR3) hastalığın gelişim döneminde yangısal hücrelerin yangı bölgesine sevkiyatında anahtar bir rol oynadığı kanısına varılmıştır. Farelerin anti-CR3 mAb antikorlarıyla muamele edilmesinin, bakterinin dalakta ve karaciğerde daha fazla çoğalmasına ve enfeksiyondan itibaren 3 gün içerinde enfekte farelerde yüksek ölüm oranlarına yol açtığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada yapılan histolojik incelemede mononükleer fagositik hücrelerin bakteri

üreme alanlarına göç etmediği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, CR3 kompleman sistemi reseptörünün farelerde primer ve sekonder *C. pseudotuberculosis* enfeksiyonlarında hücresel bağışıklığın gelişmesinde anahtar bir görev üstlendiğini göstermiştir.

Pépin ve ark. (57), koyunlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, koyunlara zayıflatılmış ve virülens *C. pseudotuberculosis* suşları inoküle ederek, enfeksiyon esnasında sitokin mRNA'nın ekspresyonunu incelemişlerdir. Bu çalışmada, deneysel inokülasyon alanında, yangısal sitokin TNF-α ve interlökin-1β (IL-1β) üretiminde görev alan mRNA miktarında artış görüldüğü tespit edilmiştir. Ayrıca, sitokin IL-2 ve IL-4 gruplarının mRNA regülasyonunun arttığı belirlenmiştir. TNF-α, IL-2 ve IFN-γ seviyeleri en yüksek inokülasyondan 7 gün sonra elde dilmiş, en yüksek IL-1 ve IL–6 mRNA ekspresyonu ise inokülasyondan 28 gün sonra elde edilmiştir. IL-1β, IL–6, IL-8, TNF-α ve monosit chemoattractant protein-1 (MCP-1) üretimi için gerekli olan mRNA seviyesi lenf yumrularında granülom bulunan hayvanlarda daha yüksek bulunmuştur. Bu bulguya dayanarak granülomların gelişmesinin nedenin Th1 ve Th2 hücrelerinin mevcudiyeti ve IFN-α, IL-2, IL-4, TNF-γ ve MCP-1 gibi sitokinlerin miktarının artmasına bağlı olabileceği öne sürülmüştür. Bu çalışmayla elde edilen sonuçlara göre *C. pseudotuberculosis* enfeksiyonun sınırlandırılmasında granülomların önemli bir rol oynadığı ileri sürülmüştür (57).

Aşıların formalinle muamele edilmesinin antijenlerin hücresel bağışıklığı tetikleyecek yapılarının bozulmasına yol açabileceği bildirilmiş olup (6), bu şekilde hazırlanmış bakterin-toksoid kökenli aşıyla aşılanan keçilerin kanlarında TNF-γ üretiminin yetersiz düzeyde oluşu bu hipotezi desteklemiştir (98).

2.1.10. KORUMA VE KONTROL

Hastalığın ilaçlarla etkin bir tedavisinin olmaması, etkenin doğa şartlarına dayanıklı olması, yetiştiricilerin hastalık hakkında yeterli bilgiye sahip olmaması ve subklinik vakaların tespitinin zorluğu hastalığın eradikasyonu güçleştiren başlıca faktörlerdir (6). Hastalığın kontrol edilmesinde aşıdan başka, apse meydana gelen hayvanların ve testlerle klinik belirti göstermeyen taşıyıcıların sürüden çıkarılması yöntemine başvurulması gerektiği bildirilmiştir (6-8, 69). Bazı ülkelerde uzun yıllar süren aşılama programları ile hastalıkta gerileme olmasına rağmen, yetiştiriciler tarafından kuzuların rapel ve erginlerin yılda bir kere aşılanmasına yeterince uyulmamasından dolayı, hastalıktaki beklenen gerileme tahmin edilenden daha az olmuştur (6). KLA'ya karşı

etkili bir bağışıklığın oluşturulması için pek çok aşı çalışması yapılmış olmasına rağmen hastalığa karşı tam bir bağışıklığın sağlandığı bir aşının geliştirilemediği vurgulanmıştır. Bunun nedeninin etkenin hücre içi fakültatif bir bakteri olması ile bağışıklıkta humoral bağışıklığın yanında hücresel bağışıklığın da büyük rol oynamasından kaynaklandığı ifade edilmiştir (6, 49, 67, 108, 109).

Koyunlarda kullanılmak üzere KLA için pek çok aşı geliştirilmiştir; ancak aşıların kullanılmasından önce sürüde hastalığın mevcudiyetinin kontrol edilmesi gerektiği vurgulanmıştır (3, 6). Avustralya ve Amerika'da hastalığın kontrol edilmesine yönelik toksin ve tüm bakteri içeren pek çok aşı geliştirilmiş olup bu aşıların sahada yeterli bir koruma sağladığı bildirilmiştir (3, 6, 110-112). *C. pseudotuberculosis* aşısına levamizol ilavesinin bağışıklığı arttırmadığı (113), muramil dipeptidin adjuvan olarak kullanılmasının ise faydalı olduğu rapor edilmiştir (105).

KLA'ya karşı bağışıklığın sağlanması için farklı aşı tipleri geliştirilmiştir. Bu aşılar hazırlanırken antijen olarak bakterinin tamamı (105, 111), hücre duvarı (111) ve/veya inaktive edilmiş FLD toksini (114) kullanılmış olup, günümüzdeki preparatların çoğu *C. tetani*, *Cl. perfringens*, *Cl. septicum*, *Cl. novyi* ve *Cl. chauvoei* gibi klostridial suşlarla kombine halde piyasaya sunulmuştur (115).

Türkiye'de aşılamada Pfizer firması tarafından üretilen Glanvac 3 ve Glanvac 6 isimli aşı kullanılmaktadır. Ürün prospektüsünde yeni doğanlarda 3 aydan önce aşılama yapılmaması gerektiği (maternal bağışıklıktan dolayı) bu aşılamadan 4 hafta sonra rapel ve yılda bir kez aşılamanın tekrar edilmesi önerilmiştir.

İzgür ve ark. (116), Türkiye'deki lokal *C. pseudotuberculosis*-PI 18 suşunun, $1,5x10^8$ cfu/ml bakterin + toksoid + ½ Freund's complete adjuvant'ı (FKA) şeklinde hazırladıkları aşının kullanılmasının koyunları KLA'ya karşı korumada başarılı olduğunu belirtmişlerdir.

O'Reilly ve ark. (8), çeşitli kontrol stratejilerini karşılaştırdıkları çalışmalarında, tek başına aşılama veya tek başına klinik muayene ile kontrol yöntemlerine göre, hem aşılama hem de klinik belirtilerin kombine şekilde kontrol stratejisi olarak uygulanmasının hastalığın prevalansının sürüde düşmesine daha hızlı bir şekilde yardımcı olacağını ifade etmişlerdir. Paton ve ark. (117), KLA ya karşı aşılanan ve doğal olarak enfeksiyona maruz kalan koyunlarda enfeksiyon oranın % 74 oranında azaldığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, KLA'ya karşı aşılanan, aşılandıktan sonra

enfeksiyona maruz bırakılan koyunlarla temas eden koyunlarda enfeksiyon oranın % 97 azaldığını bildirmişlerdir. Söz konusu araştırmada aşılanmayan koyunlarda enfeksiyon oranın % 76 düzeyinde seyrettiği, aşılanmamış koyunlarda 4 ve 5. kırkımlarda bulaşma oranın, yüzeysel apse patlaması olmadığı halde, % 77 oranında seyrettiği bildirilmiştir. Bu bulgulara dayanarak, KLA'da temel bulaşma yolunun akciğer apselerinden drene olan eksudatın kırkım yaraları vasıtasıyla bulaşması olduğu, aşılanan koyunlarda aşılanmayanlara göre % 96 oranında daha az akciğer apsesi tespit ettiklerini bildirilmiştir.

Eggleton ve ark. (115), koyunları adjuvanlı toksoid bir aşıyla ve adjuvan, toksoid, sodyum selenit ve 5 farklı klostridial suş içeren karma bir aşıyla aşılamış, sodyum selenit veya klostridial toksoidlerin ilave edilmesinin sadece toksoid içeren aşılamayla farklı bir koruma sağlamadığı tespit etmişlerdir. Yazarlar, toksoid miktarıyla oluşan koruma arasında pozitif bir korelasyon olduğunu ileri sürmüşlerdir. Kromotografi ile saflaştırılan toksoidin de aynı düzeyde bağışıklık meydana getirdiğini, dolayısıyla bakteri tarafından salgılanan toksinlere karşı bağışıklığın temel bir faktör olduğunu ileri sürmüşleridir. Eggleton ve ark. (118), bakteri hücresi içermeyen, sadece toksoid içerikli bir aşı ve hem toksoid hem de formalinle öldürülen bakteri hücresini içeren bir aşıyla yaptıkları araştırmada, sadece toksoid içeren aşının hayvanlarda yeterli düzeyde koruma meydana getirdiğini, korumanın düzeyinin aşıya ölü bakteri hücresi ilavesiyle artış göstermediğini tespit etmişlerdir. Brown ve ark. (114), bakterinin ilk çoğalma evresinde anti-egzotoksinlerin mevcudiyetinin, bakterinin çoğalmasını ve yayılmasını engelleyebileceğini ileri sürmüşlerdir.

İzgür ve ark. (116), yaptıkları aşı geliştirme çalışmasında, lokal suşlardan *C. pseudotuberculosis*-Pl 18 ve Cy 5 suşlarını kullanmış, kolostrum verilmeyen kuzularda, bu suşlarla hazırlanan tam bakteri, bakteri duvarı veya toksoid aşılarıyla aşılamayı müteakip, oluşturulan bakteriyel tehdide karşı iyi bir koruma oluştuğunu tespit etmişlerdir. Piontkowski ve Shivvers (112), *C. pseudotuberculosis* bakterin+toksoidi içeren ticari aşıların (Caseous D-T, Colorado Serum Co. Denver, ABD) canlı *C. pseudotuberculosis* etkeninin derialtı yoldan enjeksiyonuna ($1.95x10^5$ cfu/ml) karşı oluşturulan tehdide karşı hayvanlarda yeterli düzeyde koruma sağladığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada tehdit oluşturulan gruplarda KLA semptomlarının kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur.

2.2. OKSİDATİF STRES VE BAĞIŞIKLIK

2.2.1 Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri

Oksidatif stres, hücrelerde çeşitli hasarlara yol açan reaktif oksijen türleri (ROT) ile antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengesizlik olarak tanımlanabilir (119, 120). Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve biyolojik yapılarla reaksiyona girme eğilimi gösteren reaktif moleküllerdir (119). Organizmada doğal süreçler sonucunda meydana gelen ROT ile antioksidan moleküller arasındaki denge ROT lehine değiştiğinde hücrede oksidatif stres ve bunun sonucunda patolojik bozukluklar meydana gelir (120). Oksidatif strese karşı mücadele, vücudun her yerindeki farklı hücre yapılarında, karmaşık antioksidan mekanizmalar ile hayat boyu durmaksızın devam eder (119, 120).

Oksijenin bir kısmı *in vivo* şartlarda hücreler için zararlı türevlere metabolize olabilir. Hücrelerde kullanılan oksijenden, süperoksit (O_2^{-1}) ve nitrik oksit (NO^-) gibi zararlı reaktif moleküller açığa çıkar (121, 122). Normal fizyolojik şartlarda organizma tarafından alınan oksijenin % 2'lik bir bölümü hücredeki doğal kimyasal süreçler esnasında süperoksite çevrilir (122). Hücrede meydana gelen serbest radikaller daha sonra organizmadaki moleküllerle birleşerek, hidroksil (OH^-), alkoksil (RO^-), peroksil (ROO^-), singlet oksijen ($^1O_2$) oluşur. Reaktif oksijen türlerinin bazıları hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksinitrit ($ONOO^-$) ve hipokloröz asit (HOCl) gibi moleküller dönüşebilir (122). Organizmadaki ROT miktarı yangı, egzersiz, çevreyi kirleten maddeler, ultraviyole ışığına ve iyonize radyasyona maruz kalma gibi pek çok durumda artmaktadır (122).

Oksijenin kullanılması sonucunda hücrelerde oluşan ROT belirli konsantrasyonların üzerine çıktığında, organizma antioksidan savunma mekanizmalarıyla oluşan bu radikalleri etkisiz hale getirmeye çalışır (122, 123). Antioksidan savunma temel olarak enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma mekanizmaları şeklinde ikiye ayrılır. Enzimatik antioksidanlar genel olarak SOD, CAT ve GSH-Px enzimlerinden oluşur ve ROT'un etkisizleştirilmesinde primer savunma mekanizması olarak görev yaparlar. Enzimatik olmayan antioksidanlar, hücre zarında bulunan glutasyon (GSH), α-tokoferol (E vitamini), askorbat, bilirubin gibi bir takım düşük ağırlığa sahip moleküller olup antioksidan savunmada önemli bir rol oynarlar (122).

Antioksidan mekanizmalar ROT moleküllerini etkisizleştirmekte yetersiz kalırsa, oluşan serbest radikaller hücredeki protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asit ve enzimlerle reaksiyona girerek bunların yapılarını ve fonksiyonlarını bozabilirler. ROT ile antioksidan savunma sistemleri arasındaki hassas dengenin oksidatif stres güçleri lehine dönme eğiliminde olduğu ve dolayısıyla organizmanın sürekli olarak oksidatif stres tehdidi ile karşı karşıya bulunduğu ifade edilmiştir (123).

Reaktif oksijen türlerinin, normal metabolik tepkimelerin doğal bir sonucu olduğu ve belirli düzeyde kaldıkları sürece, organizmanın yabancı maddelere ve enfeksiyon ajanlarına karşı savunma ve bağışıklık sistemin doğru çalışması için gerekli oldukları bildirilmiştir (123). Düşük düzeyde ROT konsantrasyonu, genel anlamda organizmada hücre büyümesi ve enfeksiyonlara karşı savunma (122); gen ekspresyonu ve hücre büyümesinde rol oynayan nükleer faktör-kappa B (NF-kB) ve aktivatör protein-1 (AP-1) gibi transkripsiyon faktörlerinin stimüle edilmesi (122); mitojenle aktive protein kinaz (MAPK) gibi sinyal transdüksiyon moleküllülerini aktive ederek transkripsiyon faktörlerinin dolaylı yoldan aktivasyonunu (124) gibi metabolik olaylarda rol oynar. ROT organizmada gelişim aşamalarında daha fazla rol alıyor gibi gözükmektedir. Denizkestanelerinin üreme döneminde ROT miktarında artış meydana geldiği, memelilerde prenatal ve embriyonik gelişim aşamalarının ROT tarafından regüle edildiği bildirilmiştir (124). ROT gelişim süreçlerini hızlandıran tiroksin, prostoglandin gibi moleküllerin biyosentez aşamalarına da katılmaktadır. Ayrıca tiroit hücrelerinde iyot atomlarının tiroglobulin 3'e bağlanmasını katalize eden tiroksin sentezinde kritik rol oynayan H_2O_2 konsantrasyonlarının düzenlenmesinde görev almaktadır (124). ROT bağışıklık sisteminde NF-κB aktive etmek suretiyle T hücrelerinin çoğalmasını tetiklemektedir. Makrofaj ve nötrofillerin, fagosite ettikleri bakterileri öldürmek için ROT kullandıkları bildirilmiştir (124). *C. pseudotuberculosis* ve *M. Tuberculosis* gibi, ROT radikallerinden korunma stratejileri geliştiren bakterilerin, fagositozdan korunabildiği ve bu yolla hücre içi paraziti haline geldiği bildirilmiştir (43). Bazı çalışmalarda çeşitli stimülasyonlara bağlı olarak, serbest radikallerin hücrelerce düşük miktarda salgılandığı, dolayısıyla oksijen radikallerinin, TNF ve IL-1 gibi immunmodulatör sitokinler ve NF-kB sistemini aktive eden mekanizmalar için sekonder mesajcılar olarak görev yaptığı bildirilmiştir (124).

2.2.2. ROT Kaynaklı Hücre Hasarı

ROT moleküllerinin, irkiltici kimyasal maddelerin etkisi altında kalma, karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksikasyonları, iyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliği yapan kimyasal maddeler, sigara dumanı, gibi çevresel faktörler, nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin gibi antineoplastik ajanlar, alkol ve uyuşturucular gibi alışkanlık yapıcı maddeler, arteriyoskleroz, nörodejenerasyon gibi hastalıklar, kanser, romatid artrit, parkinson, alerjiler, diyabet, katarakt, AIDS, hepatit C, koyun çiçeği gibi pek çok enfeksiyon ve yaşlanma gibi süreçlerde önemli rol oynadıkları bildirilmiştir (125, 126-129).

ROT molekülleri, hücredeki doymamış lipidler, protein ve DNA gibi biyo-moleküllerle reaksiyona girer ve lipid radikalleri, şeker, baz ve aminoasit radikalleri gibi sekonder radikaller meydana getiriler. Bu radikaller oksijen mevcudiyetinde, biyo-sistemlerde zincirleme reaksiyonları harekete geçiren peroksil radikallerine dönüşürler (130). Bu reaksiyonların biyolojik etkileri, reaksiyonun meydana geldiği bölgeye, etkilenen substratın özelliğine, onarım mekanizmalarının işleyişi ve organizmanın redoks durumu gibi birçok faktöre bağlıdır (131).

2.2.3. Lipid Peroksidasyon

Hücre zarı, yapısında fazla miktarda doymamış yağ asidi bulunmasından dolayı ROT tarafından oksidasyona karşı oldukça hassastır (122). ROT molekülleri bu yapılarla etkileşime girdiğinde lipid peroksidasyon meydana gelir, bunun sonucunda lipid hidroperoksit ($LOOH^-$) oluşur. Bu molekülden daha sonra MDA, 4-hidroksi nonenal (4-HNE) gibi lipid peroksidasyon ürünleri olan aldehitler meydana gelebilir (122).

Lipid peroksidasyon dört aşamada gerçekleşir: i) başlama aşaması: bir yağ asidinin metilen kısmından bir hidrojen atomu (H^+) koparak bir lipid radikali oluşur; ii) ilerleme aşaması: oluşan radikaller yeniden moleküler düzenlemeye girerek oluşturdukları konjuge moleküllerin O_2^{-1} ile zincirleme reaksiyonu sonucu lipid peroksil ve lipid peroksit radikalleri oluşur. Peroksil radikalleri bir araya gelerek birleşebilirler veya hücre zarındaki proteinlere bağlanabilirler. Peroksil radikalleri bitişiklerinde bulunan doymamış yağ asitlerinden de bir hidrojen atomunun kopmasına yol açarak zincirleme bir lipid peroksidasyon reaksiyonuna yol açabilirler. Bu şekilde, bir molekül yağ asidinin peroksidasyonu neticesinde yüzlerce yağ asidinin peroksidasyonu gerçekleşebilir. Bu zincir reaksiyonun uzunluğu hücre zarının lipid-protein içeriği

oranına, yağ asitlerinin yapısına, oksijen radikalinin konsantrasyonuna veya hücre zarında bulunan bu reaksiyonu durdurabilecek antioksidan moleküllerin yoğunluğuna bağlıdır; iii) yıkım aşaması: hücre zarındaki doymamış yağ asitlerindeki lipidlerin yıkımı ile MDA, 4-HNE gibi moleküllerinin oluşması ve iv) sonlandırılma aşaması: oksidasyon reaksiyonunun hücre zarında bulunan E vitamini gibi zincir kırıcı gibi antioksidanlar tarafından sonlandırılması (132, 133).

Lipid peroksidasyon neticesinde 1) hücre zarı katmanlarının akışkanlığı değişir 2) hücre zarının termotrofik faz davranışı değişir 3) zardaki elektriksel direnç düşer ve 4) hücre katmalanları arasındaki fosfolpidlerin yer değişimi kolaylaşır (133). Tüm bu değişiklikler hücre zarının yapısının bozulması hücre zarının iletkenliğinde değişmeye neden olur, bunun neticesinde iyonların hücre içine geçişi kolaylaşır, bu da hücre fonksiyonlarının aksamasına yol açar (133, 134). Hücre zarının yarı geçirgen özelliğini kaybetmesi, hücre zarında yer alan ve taşımada görevi bulunan enzim sistemlerinin görevlerini yapamaması, hücre dışı ve içi iyon yoğunluğunun değişmesi hücrelerde önemli hasarlara yol açar ve bu durum geri çevrilemezse hücrenin ölümüne kadar gidebilir (132-135). Lipid peroksidasyon sonucunda çıkan en önemli ürünler MDA ve 4-HNE olarak sıralanabilir.

2.2.3.1. Malondialdehit

Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü MDA'dır. MDA, üç ya da daha fazla çift bağ içeren çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda oluşur (136). Memelilerde MDA oluşumuna en çok araşidonik asit gibi çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu yol açmaktadır. Oleik ve linoleik gibi doymamış yağ asitleri daha az oksidasyona uğramakta ve dolayısıyla bunlardan daha az miktarda MDA oluşmaktadır. Organizmada meydana gelen lipid peroksidasyonun belirlenmesinde MDA ölçümü en hassas yollardan biridir (134, 137, 138).

Yapılan pek çok araştırmada patolojik durumlarında MDA düzeylerinde yükselme meydana geldiği tespit edilmiştir. Madebo ve ark. (139), ve Safarian ark. (140), tüberkülozlu hastalarda MDA seviyesinin yükseldiğini tespit etmişlerdir. Kandemir ve ark. (141), brucella ile enfekte vakalarda MDA seviyelerinin yüksek olduğunu, bu hastalardaki MDA düzeylerinin daha sonra tedaviyle düşme gösterdiğini tespit etmişlerdir. Demir ve ark. (142), *Helicobacter pylori* kaynaklı gastritli hastalarda MDA'nın kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Özçelik ve

ark. (143), pnömönili hayvanlarda, lipid peroksidasyonun göstergesi olan MDA miktarında önemli bir artış tespit etmişlerdir.

Kızıl ve Gül (144), besi sığırlarında şap aşısı uygulamasında vitaminlerin antioksidan etkileri ve lipid peroksidasyon düzeyleri ile ilgili yaptıkları çalışmada, aşılama sırasında AD_3E vitaminleri uygulanan ile Aşılama sırasında vitamin C ve AD_3E + 3 gün sonra vitamin C uyguladıkları gruplarda 0 ile 21. gün değerleri karşılaştırıldığında MDA düzeylerinde artış meydana geldiğini bulmuşlardır.

Jovanović ve ark. (145), doğumu başlatmak için prostoglandin F2α (PGF2α) uygulanan ineklerde Se ve E vitamini uygulaması yaptıkları çalışmada Se ve E vitamini uyguladıkları hayvanlarda kontrollere göre daha düşük retensiyo sekundinaryum ve MDA değerlerinin elde edildiğini bildirmişlerdir.

Avcı ve Kızıl (146), gebe ineklerde yaptıkları çalışmada, kontrol ve deneme grubunda doğumda MDA değerlerinde artış meydana geldiğini bildirmişlerdir. Kontrol grubunda doğumda artış gösteren MDA değerinin doğumdan sonra da artmaya devam ettiği hatta doğumdan 3 hafta sonra yapılan ölçümlerde bile MDA konsantrasyonunun yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Deneme grubunda ise doğum zamanında yükselen MDA konsantrasyonunun Se içeren mineral takviyesi ile doğumu takiben azalma gösterdiğini bildirmişlerdir. Yazarlar deneme grubunda meydana gelen bu azalmanın, uygulanan mineral maddelerden, özellikle Se'nin, meydana gelen oksidatif stresin azaltmasına ve savunma sistemlerini güçlendirmesine bağlı olduğunu ifade etmişlerdir.

2.2.4. Protein Hasarı

Proteinler ROT molekülleriyle reaksiyona girerek zincir yapılarında değişme proteolitik dejenerasyon, protein-protein bağları meydana gelir (122). Proteinlerin oksidasyonu sonucunda genelde aldehit ve keton gibi karbonil grupları meydana gelir (122). Sistein, metiyonin ve triptofan gibi amino asitler serbest oksijen radikallerine karşı daha hassastır. Serbest oksijen grupları özellikle hücre zarında önemli görevleri bulunan proteinlerde çeşitli yapısal bozukluklara yol açarak bunların fonksiyonlarını bozarlar (121). Lipid peroksidasyon ürünü olan MDA gibi aldehitler proteinlerin amino gruplarıyla reaksiyona girerek Schiff bazlarını oluşturabilirler (120).

2.2.5. DNA Hasarı

DNA stabil yapılı, iyi korunan bir molekül olasına rağmen, ROT saldırısına maruz kalabilmektedir. Bu saldırı sonucunda DNA baz yapısında değişiklik, tek ve çiftli DNA ipliklerinde kırılmalar, purinlerin kaybı, deoksiriboz şeker moleküllerinde hasar, DNA-protein çapraz bağlarının oluşması ve DNA onarım sistemlerinde önemli aksamalar meydana gelir. Bütün ROT molekülleri arasında OH^- radikalleri DNA zararına en fazla yol açan moleküllerdendir. Serbest radikaller şeker moleküleriyle de etkileşime girmekte ve iplik kırılmalarına yol açmaktadır. DNA hasarı neticesinde genetik materyalde değişim meydana gelir bunun sonucunda hücre ölümü, mutasyon, kanser ve yaşlanma meydana gelmektedir (135).

2.2.6. Antioksidanlar

Antioksidan madde dokularda düşük konsantrasyonda bulunduğunda, okside olabilen substratın oksidasyon reaksiyonlarını engelleyen, geciktiren veya durduran madde olarak tanımlanmıştır (122, 143-147). ROT moleküllerinde meydana gelen aşırı artış sonucu oksidatif stres meydana gelir, hücreler bu artışa karşı koymak için antioksidan mekanizmalar geliştirmişlerdir. Antioksidanlar, serbest radikallerin temizlenmesinde ve dolayısıyla oksidatif hasarın önlenmesinde oldukça önemlidirler. Oksidatif stres sürecinde antioksidanlar farklı mekanizmalarla etkili olmaktadır: i) oksijen konsantrasyonunu azaltarak ya da lokal düzeyde oksijeni uzaklaştırarak, ii) serbest radikal oluşumunu katalize eden Cu ve Fe gibi metal iyonlarını uzaklaştırarak, iii) oksidatif süreçlerde kilit rol oynayan süperoksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerini uzaklaştırarak, iv) başlangıç aşamasındaki hidroksil, alkoksil ve peroksil türlerini etkisizleştirerek v) zincirleme oksidasyon reaksiyonlarını durdurarak vi) singlet oksijeni temizleyerek ya da suya dönüştürerek etki gösterirler (120).

Antioksidanlar, hücrede meydana gelen serbest radikalleri toplayıcı, bastırıcı, onarıcı ve zincir kırıcı etki mekanizmalarıyla zararsız hale getirirler. Toplayıcı etki mekanizmasında, CAT, SOD ve GSH-Px gibi antioksidan enzimler ROT'ları bağlar ve daha az reaktif başka moleküllere dönüştürürler. Bastırıcı etki mekanizmasında flavinoidler ve vitaminler gibi bazı antioksidanlar ROT'lar ile etkileşerek onlara bir proton ekleyerek ROT moleküllerinin etkinliklerinde azalmaya neden olmaktadırlar. Zincir kırıcı etki mekanizmasında, vitaminler gibi bazı antioksidanlar ROT'ların başlattığı lipid peroksidasyon gibi zincirleme reaksiyonları sonlandırarak etki

göstermektedirler (148). Glutasyon gibi moleküllerin hasara uğramış hedef hücreleri onararak, onarıcı etki meydana getirdikleri bildirilmiştir (147).

Her ne kadar yapılan bazı çalışmalar ROT sisteminin tamamen bloke edilmesinin bağışıklık sisteminin fonksiyonunu engelleyebileceği ve yüksek düzeyde antioksidan seviyesinin oksidan etkiler meydana getirebileceği yönünde şüphelere dikkat çeken çalışmalar varsa da, genelde antioksidanların tatbik edilmesinin bağışıklık fonksiyonlarını iyileştirdiği bildirilmiştir (149).

Hücre zarında temel antioksidan savunma sistemleri C vitamini, GSH, n-asetilsisteyin (NAC) ve E vitamini üzerine kuruludur (149). Tüm bu antioksidanların bağışıklık sistemini güçlendirdiği hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak gösterilmiştir (149-151). Antioksidan takviyesinin, IL-2 seviyelerinde, T-hücre tipleri ve öldürücü hücrelerin sayılarında, antijen stimülasyonu sonucunda antikor cevabında artışa, lipid peroksidasyonda ve prostoglandin sentezinde azalmaya yol açtığı bildirilmiştir (152). Köpeklerin yemlerine antioksidan ilave edilendir çalışmada dolaşımdaki antioksidan seviyelerinin arttığı DNA hasarının azaldığı, dolayısıyla, aşılama sonrası immunglobulin oluşumunun daha hızlı ve antikor seviyelerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (153).

2.2.6.1. Süperoksit Dismutaz

Süperoksit dismutaz enzimi hücre içi bir enzim olup süperoksiti H_2O_2 ve moleküler oksijene çeviren reaksiyonu katalize eder. Hücresel kompartımanlardaki O_2^{-1} düzeyleri SOD tarafından sağlanan bu primer savunma sistemi sayesinde kontrol altında tutulur (122). Hücrelerde süperoksit dismutazın üç tipi vardır: bakır (Cu) ve çinko (Zn) içerenler CuZnSOD olarak bilinir ve sitozolde yer alırlar. Mangan (Mn) içerenler, MnSOD olarak isimlendirilmekte ve mitokondrilerde yer almaktadır. Üçüncüsü hücre dışında yer alan SOD'dur ve plazma membranı yüzeyinde bulunmaktadır. SOD'un her üç formu da metal iyonlarının varlığında (Cu ve Fe) süperoksit anyonlarını H_2O_2'ye çevirir. Bu enzim süperoksitlerin ortamdaki derişimini azalttığından, reaktif nitrik oksit türlerinden olan peroksinitritin de oluşumunu önleyici etkilere sahiptir (148).

Organizmada hastalık durumlarında SOD düzeylerinde azalma meydana geldiğini bildiren pek çok çalışma vardır. Marikovsky ve ark. (154), makrofajların TNF-α, IL-1 ve IL-6 gibi proinflamatör sitokinleri üretmesi sayesinde yangı süreçlerinin aktivasyonunda ve bağışıklığın düzenlenmesinde önemli görevleri olduğunu, SOD

miktarında gerçekleşen artışın makrofajların yükselen ROT seviyeleriyle daha rahat başa çıkmasına yardımcı olduğunu ve bağışıklık cevabında artışına neden olduğunu bildirmişlerdir. Yazarlar, Cu/ZnSOD enziminin disülfiram ile *in vivo* olarak inaktive edilebildiğini, Cu/ZnSOD inakitve edilen periton kaynaklı makrofajlarda TNF-α üretiminde azalma meydana geldiğini bildirmişlerdir. Break ve ark. (155), ekstraselüler ortamda fazla miktarda SOD bulunmasının nötrofillerin bağışıklık cevabını azalttığını ve hücre içi bakterilerin temizlenmesini zayıflattığını bildirmişlerdir. Yazarlar *L. monocytogenes* enfeksiyonu esnasında ekstraselüler SOD düzeyinde artışla birlikte karaciğer lökositlerindeki NO_3^- ve TNF-α üretiminde azalma meydana geldiğini, bu durumun nötrofil fonksiyonlarını olumsuz etkilediğini bildirmişlerdir. Vouldoukis ve ark. (156), hücre içi Cu/ZnSOD üretiminin sitimüle edilmesinin, süperoksit anyonunda azalmaya, NO üretiminde artışa ve dolayısıyla NO'ya bağlı mekanizmalarla hücrelerin apoptozisinin azalmasına yol açtığını bildirmişleridir.

Stỳblo ve ark (157), influenza A/Bangkok/1/79 ile enfekte edilen Se eksikliği bulunan ve normal farelerde yaptıkları çalışmada, Se yetersizliğinin ve influenza enfeksiyonun SOD aktivitesi üzerine önemli etkisi olduğunu tespit etmiş, karaciğerde SOD aktivitesinin Se yetersizliği bulunan farelerde enfeksiyonda önce Se düzeyi normal olan gruba göre daha yüksek olduğunu ancak enfeksiyondan sonra Se düzeyi normal olan grupta SOD aktivitesinin önemli bir yükselme gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, influenza enfeksiyonun Se yetersizliği bulunan farelerde daha fazla SOD yükselmesine neden olmasının Se yetersizliğini veya influenza enfeksiyonu kompanze etmek için olduğunu bildirmişlerdir.

2.2.6.2. Katalaz

Katalaz, başlıca peroksizomlarda lokalize olan ve yapısında dört hem grubu bulunduran bir protein yapılı hücre içerinde bulunan antioksidan enzimdir (148). Katalaz, bütün organlarda bulunmakla beraber özellikle karaciğer ve eritrositlerde daha yüksek seviyelerde bulunmaktadır. Süperoksit dismutaz tarafından süperoksitin dismutasyonu reaksiyonu sonucunda meydana gelen H_2O_2 biyolojik moleküller için zararlıdır (123, 158). Katalaz, H_2O_2'yi reaktif olmayan moleküler oksijene ve suya parçalar, böylece hücreleri H_2O_2 reaksiyonlarından kaynaklanan oksidatif hasara karşı korur. Katalaz enziminin reaktif nitrik oksit türlerinin oluşumunu da önlediği bildirilmiştir (159).

Katalaz aktivitesi siyanürle inhibe edilebilmektedir. Bu enzimin, metanol ve etanol gibi alkolleri, formaldehit ve asetaldehite oksitllediği de bildirilmiştir (148).

Stỳblo ve ark (157), influenza A/Bangkok/1/79 ile enfekte edilen Se yetersizliği bulunan ve normal farelerde yaptıkları çalışmada, gruplar arasındaki CAT aktivitelerinde, ne Se'ye bağlı, ne de enfeksiyona bağlı önemli bir fark olmadığını bildirmişlerdir. Avcı ve Kızıl (146), gebe ineklerde yaptıkları çalışmada deney ve kontrol grubunda CAT düzeylerinde doğum zamanı gözlenen azalmaların yoğun stres nedeniyle kullanımlarının artışından kaynaklanmış olabileceğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, doğumdan sonraki süreçte görülen enzimdeki azalmayı stresin mevcudiyetinin devam etmesine bağlamışlardır. E vitamini ve Se takviyesi yaptıkları deneme grubunda doğum sonrası enzim düzeyinde meydana gelen artışın ise oksidatif stresin azaldığına işaret ettiğini bildirmişlerdir.

2.2.6.3. Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksiti ve büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerin yıkılmasını sağlayan önemli bir antioksidandır. Glutasyon peroksit enzimi, glutasyonu (GSH) okside glutasyona (GSSG) katalize etmek suretiyle hidrojen peroksidi suya dönüştürerek hidrojen peroksitin etkisiz hale gelmesini sağlar (120). Glutasyon tiyol ve sülfhidril (SH^-) grubu içeren hafif bir molekülü olup glutasyon peroksidaz enziminin kofaktörüdür (147). Glutasyon peroksidaz enzimi yapısında Se elementi içerir. Dolaysıyla dokulardaki Se düzeyi enzim için önemli bir unsurdur. Enzim, eritrositlerin hücre zarlarında en yüksek, karaciğerde yüksek, kalp, akciğer ve beyinde düşük, kasta ise en düşük seviyede bulunmaktadır (148, 158). Bu enzim H_2O_2 gibi radikallerin etkisiz hale getirilmesinin yanı sıra, alkil hidroperoksitlerin oluşumunu ve hidroksil radikali gibi daha zararlı radikallerin ortaya çıkmasını da önler (120). Hücre zarlarında bulunan doymamış yağların peroksitler tarafından oksitlenmesi GSH-Px tarafından önlenmekte ve böylece hücre fonksiyonlarının devamlılığı sağlanmaktadır. Glutasyon peroksidaz aktivitesindeki azalma, H_2O_2 düzeylerinin yükselmesine ve hücre hasarına yol açmaktadır. Hidrojen peroksit ve organik peroksitlerin yıkımını katalizleyen GSH-Px, peroksinitritin yıkımını da katalize eder (148). Vücutta glutasyon depolarının tükenmesi direkt olarak glutasyon aracılığı ile oksidatif strese sebep olabileceği gibi, dolaylı olarak antioksidan enzim aktivitesinin azalması da aynı yönde etki oluşturur (148, 160).

GSH-Px ölçümü pek çok araştırmacı tarafından Se'nin organizmadaki durumunun değerlendirilmesinde kullanılmıştır (161, 162). Avcı ve Kızıl (146), gebe ineklerde yaptıkları çalışmada, deneme grubuna uyguladıkları Se takviyesi sonucunda, demene grubunda GSH-Px aktivitesinde artış meydana geldiğini ve oksidatif strese karşı savunmanın güçlendiğini bildirmişlerdir. Finch ve Turner (163), kuzularda S*almonella dublin*'e karşı oluşan antikor titrelerini değerlendirmek üzere yaptıkları çalışmada, Se düzeylerinin göstergesi olarak GSH-Px seviyelerine bakmış 5 mg Se ile muamele edilen gruplarla kontrol grubu arasında önemli bir fark tespit etmemişlerdir.

Stỳblo ve ark (157), Se yetersizliğinde GSH-Px aktivitesinde azalma meydana geldiğini, Se yetersizliğinin ve influenza virüsünün akciğerdeki GSH düzeylerinde önemli bir değişmeye yol açmadığını, karaciğerdeki GSH konsantrasyonlarının ise Se yetersizliği bulunan enfekte farelerde daha düşük olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada GSH-Px, Se yetersizliği bulunan enfekte farelerde akciğer ve karaciğerde önemli derecede düşme görüldüğünü tespit edilmiştir.

Özçelik ve ark. (143), GSH-Px düzeyi hasta grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede düşük bulunmuştur. Yazarlar, GSH-Px aktivitesindeki bu azalmanın, hidrojen peroksidin artışı ve buna bağlı hücre hasarının göstergesi olarak açıklamışlardır.

Leyan ve ark. (164), tetanoz toksoidi ve *Brucella abortus* RB51 suşu uygulanan düvelerde Se ilavesinin bağışıklık üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmada, aşılamayla birlikte Se ilave edilen düvelerde GSH-Px düzeylerinde anlamlı bir yükselme meydana geldiğini, ancak bununla beraber IgG antikorlarında önemli bir yükselme meydana gelmediğini bildirmişlerdir.

2.2.6.4. Glutasyon Redüktaz

Glutasyon redüktaz (GSH-Rd) enzimi glutasyon peroksit mevcudiyetinde oksidasyona uğrayan glutasyonu, tepkimelerde tekrar kullanılmasını sağlamak üzere redükte glutasyona çevirir (148). Bu enzim, oksidatif reaksiyonlar sırasında oluşan disülfit bağlarını da indirger. Enzimin optimum aktivite gösterebilmesi için, kofaktör olarak flavin adenin dinükleotit (FAD) gerekmektedir. Ortamda askorbatın yüksek düzeyde bulunmasının, GSH-Rd reaksiyonunu hızlandırdığı ifade edilmiştir (148).

2.2.7. Nitrik Oksit

Nitrik oksit serbest radikal olmasına rağmen biyolojik moleküllere fazla bir bağlanma eğilimi göstermez (120). Nitrik oksit hücrelerde L-arjininden indüklenebilir nitrik oksit sentetazın (iNOS) varlığında üretilmektedir (147). Süperoksitle reaksiyona girerek daha güçlü oksidan radikal olan peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşur (120). Hücresel bağışıklık sisteminde, özellikle sitotoksik hücrelerin fonksiyonlarında NO'nun önemli bir rolü vardır. Bu önemli ve karmaşık moleküler mekanizmada, NO üretimi, sitokinler ve mikrobiyel ürünlerin, transkirpisyon mekanizmalarını harekete geçirmesi vasıtasıyla olur.

Organizmada NO daha çok enfeksiyöz ve yangısal hastalıklarda artış göstermektedir. Makrofajlar tarafından üretilen NO, virüs, bakteri, mantar, protozoa, helmint gibi patojenlere ve tümör hücrelerine karşı sitotoksik etkinin temelini oluşturur. Diğer yandan, NO, ilginç bir şekilde, lenfositlerin aşırı çoğalmasın engellenmesi ve konakçı hücrelerine karşı hasarın bastırılmasında da rol oynamaktadır (165). Genuardi ve ark. (166), makrofajlar tarafından salgılanan antibakteriyel özellikler sergileyen NO'nun sadece bakteriyel ve tümör hücrelerinin tahribatına yol açmadığını, NO'nun makrofajların kendilerinin ve çevredeki normal hücrelerin de hasarlanmasına ve fonksiyonlarının zayıflamasına yol açabileceğini bildirmiştir.

T. annulata'ya karşı bağışık sığırlarda, bağışıklık mekanizmasında NO üreten sitotoksik makrofajların etkili bir rol üstlendiği, NO sentezinin anti-paraziter etki meydana getirdiği ortaya konmuştur (167, 168). Sığırlardan doğal ve deneysel *T. annulata* enfeksiyonlarından alınan makrofajların TNF-α ve NO ürettikleri saptanmış, NO'nun, *in vitro* olarak, sporozoitlerin sığır hücrelerine invazyonunu ve trofozoitlerle enfekte hücrelerin makroşizontlarla enfekte hücre hatları haline dönüşmesini ve bu hatların çoğalmasını engellediği; hücreler içerisindeki makroşizontları yok ettiği ve konak hücresine apoptotik bir şekil kazandırdığı bildirilmiştir (168).

Deneysel olarak oluşturan *Salmonella* enfeksiyonunda NO prekürsörü olan L-arjininin harici olarak ilavesinin NO üretimini artırdığı gösterilmiştir (169). Başka bir çalışmada tüberkülozlu hastalarda dışarıya verilen nefes içerisindeki NO ölçülmüş, NO değeri düşük olan hastaların yüksek olan hastalara göre daha şiddetli bir hastalık tablosu sergiledikleri tespit edilmiştir (170). Grasemann ve ark. (171), pnömönili çocukların bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısında NO miktarının yüksek olduğunu tespit etmiştir.

Makrofajlar sistemik *Candida albicans* enfeksiyonlarına dirençte önemli bir rol oynayan ve oksidatif mikrobisidal moleküllerin üretimini sağlayan multifonksiyonel immun hücrelerdir. Makrofajlar tarafından sergilenen kandidasidial aktivitede NO önemli bir moleküldür ve NO üretiminin aynı zamanda mikroorganizmalar tarafından konakçı savunma mekanizmasının zayıflatılması için de kullanıldığı bildirilmiştir (172). NO'nun *C. neoformans*, *T. Gondii* ve *M. bovis* gibi patojenlere karşı mikrobiyostatik ve mikrobisidal etki gösterdiği bildirmiştir (173). Feng ve ark. (174), yaptıkları çalışmalarda *R. conori* enfeksiyonuna karşı endotelyal hücrelerin korunmak amacıyla NO ürettiğini göstermiştir. Schroppel ve ark. (175), makrofajların deneysel kandidoza karşı savunmada önemli rol oynadığını göstermiştir. NO üretiminin baskılanması *C. albicans* aktivitesi ve virülensliğinin artmasına yol açmıştır (175). Nisbet ve ark. (176), yaptıkları araştırmada *B. abortus* ile enfekte sığırlarda NO seviyesinin daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, bu yüksek NO seviyelerini bakteriyel liposakkaritler yüzünden makrofajlardaki NO üretiminin artışına bağlamışlardır. Prabhu ve ark. (177), makrofajlarda lipopolisakkarit stimülasyonu sonrası Se durumu ile makrofajların NO üretimi arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmalarında, organizmadaki Se düzeyi ile NO üretimi arasında ters bir ilişki olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada Se yetersizliğinde makrofajlarda NO üretiminin arttığını, bu artışın makrofajlardaki redoks tepkimelere duyarlı transkripsiyon faktörü olan NF-kB'nin aktivasyonundan kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür.

2.2.8 E Vitamini ve Selenyumun, Oksidatif Stres ve Bağışıklık Üzerindeki Etkileri

Selenyumun antioksidan etkisini hücrelerde serbest radikallere karşı çalışan sistemleri harekete geçirmek ve peroksit yıkımında görev alan GSH-Px enziminin yapı taşı olması yoluyla meydana getirdiği bildirilmiştir (178). Farelerde gentamisin ile oluşturulan böbrek hasarında MDA seviyesinin yüksek bulunması bu hasarı oksidatif stresin arttırdığını düşündürmüştür. Gentamisinle birlikte Se uygulamasının böbrekleri gentamisinin oksidatif stresle ilişkili nefrotoksik etkilerinden koruduğu bildirilmiştir (179).

Fare lenfositlerinde lipid peroksidasyonun derecesi lenfositlerin concavalin A (Con A) ile sitimüle edilmesinin ardından ölçülmüştür (180). Söz konusu çalışmada Con A ilavesinden sonra lipid peroksidasyonun arttığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada Selenyumun farelerin içme suyuna ilave edilmesinin Con A uygulamasının ardından

lenfositlerdeki lipid peroksidasyonu azalttığı da tespit edilmiştir. Selenyum ilavesi ile lenfositlerdeki lipid peroksidasyon arasında ters bir orantı olduğu, Se ilavesinin lenfosit üremesini arttırdığı tespit edilmiştir. Bu bulgular ışığında, Se molekülünün, bağışıklığı, oksijen türlerinin uzaklaştırılmasında etkili mekanizmalar üzerinde olumlu etki meydana getirmek suretiyle, teşvik ettiği ileri sürülmüştür (180).

Selenyumun, haricen uygulanan H_2O_2 ve kobalt 60 (Co-60) radyasyona karşı bağışıklık üzerindeki iyileştirici veya koruyucu etkisinin araştırılması amacıyla, Con A ile stimülasyondan sonra lenfosit üremesi ve IgG düzeyleri ölçülmüştür. Çalışmada Se'nin antioksidan kabiliyetinin ölçülmesi amacıyla lipid peroksidasyon da ölçülmüştür. Sonuç olarak, H_2O_2 saldırısının ve Co-60 radyasyonunun lenfositlerin etkinliğini ve humoral bağışıklık cevabı oldukça zayıflattığı ancak Se ilavesinin bu hasarın azaltılmasında katkı sağladığı belirlenmiştir (181).

Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, Se içermeyen diyet (0,02 ppm Se), normal (0,20 ppm Se, sodyum selenit şeklinde) veya Se-katkılı (2,00 ppm Se) Torula maya-bazlı diyetle beslenen farelerin lenfositlerinin antijenleri tanıyabilmeleri, uyarıcılar karşısında çoğalma yetenekleri ve IL-2 üretebilme kabiliyetleri incelenmiştir. Se kısıtlamasının antijen stimülasyonu karşısında lenfositlerin çoğalma kabiliyetini arttırdığı tespit edilmiştir. Se bakımından kısıtlanan veya Se ilave edilen hayvanlarda lenfosit ve makrofajlar tarafından üretilen IL-1ve IL-2 miktarının, kontrol grubunda üretilen IL-1 ve IL-2 miktarından farklı olmadığı tespit edilmiş, bu sonuçlar Se'nin lenfosit proliferasyou üzerindeki etkisinin IL-1 ve IL-2'ye bağlı olmadığını göstermiştir (182).

Yapılan başka bir çalışmada da Se takviyesinin mitojen veya allojen ile karşılaşma sonucunda lenfositlerin çoğalma kabiliyetlerini ve sitotoksik effektör hücrelere dönüşüm kapasitelerini arttırdığını gösterilmiştir. Se ilavesinin sitotoksik lenfositlerin, lenfokinle aktive edilen öldürücü hücrelerin ve makrofajların ve natürel killer hücrelerin tümör sitotoksitesini arttırdığı, bu etkilerin endojen IL-1, IL-2 veya interferon-gamma seviyelerine bağlı olmadan gerçekleştiği bildirilmiştir. Selenyumun bu etkilerini aktive edilen lenfositler ve natürel killer hücrelerin yüzeyinde bulunan IL-2 reseptörünün alfa-p55 ve/veya beta-p70/75 alt ünitelerinin ekspresyonunu artırmak suretiyle meydana getirdiği düşünülmektedir. Bunun sonucunda daha fazla sayıda fonksiyonel IL-2 reseptörüne sahip hücre meydana gelmesine ve bu sitotoksik prokürsör hücrelerin proliferasyonuna ve değişimine yol açmaktadır (183). Yapılan başka çalışmalarda da

lenfositlerin proliferasyonunun endojen IL-1 veya IL-2 seviyelerindeki değişme bağlı olmadığını, Se'nin bu etkilerini aktive edilen lenfositlerin yüzeyindeki yüksek affineteli IL-2 reseptörlerinin ekspresyon kinetiklerini değiştirmek suretiyle meydana getirdiği ifade edilmiştir. Selenyum ilavesinin makrofajların tümör hücreleri tahribat fonksiyonlarında artışa neden olduğu bildirilmiştir. Çalışmanın sonuçları Se ilavesinin, etkisini antijen stimülasyondan 8-24 saat sonra meydana getirdiği ve bu etkinin aktive olan lenfositlerin sitoplazma ve nükleer dizeydeki prosesleri etkilemek suretiyle gerçekleştiği ileri sürülmüştür (184).

Organizmadaki Se durumu ile enfeksiyonlara karşı direnç arasında bir bağlantı olduğu, hayvanlardaki Se eksikliğinin, özellikle E vitamini eksikliği ile birlikte seyrettiğinde antikor cevabını daha fazla azalttığı bildirilmiştir (162).

Sığırlarda paratüberküloz ve mineral madde eksiklikleri arasındaki ilişkinin incelendiği bir çalışmada paratüberküloz belirtisi göstermeyen, ancak alınan örneklerde yüksek düzeyde bakteri tespit edilen hayvanların çoğunda Se eksikliği bulunduğu, paratüberküloz belirtisi gösteren iki hayvanda ise şiddetli derecede Se eksikliği bulunduğu ve sonuç olarak hastalığın şiddeti ile Se arasında bir ilişki olabileceği vurgulanmıştır (185).

Larsen ve ark. (186), Se yetersizliği bulunan koyunlarda, yemle birlikte verilen Se uygulamasının antikor cevabı üzerindeki etkisi üzerine yaptıkları çalışmada, normal Se içeren yemle beslenen koyunların tetanoz, parainfluenza-3 virüsü (PI3V) ve *C. pseudotuberculosis* toksinlerine karşı iyi düzeyde bağışıklık cevabı oluşturduklarını tespit etmişlerdir. Çalışmada normal düzeyde Se içeren yemle beslenen koyunların total serum IgG konsantrasyonlarının Se yönünden fakir yemle beslenen koyunlara göre daha yüksek olduğu belirlenmiş, ancak bu yüksek değerlerin pek azının istatistiksel olarak önemli olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada 100 mg baryum selenat şeklinde Se enjekte edilen koyunlarda tetanoz toksinine karşı yüksek titrede antikor cevabı meydana gelmiş, ancak IgG konsantrasyonda bir değişiklik meydana gelmemiştir. Selenyum takviyesi yapılan koyunlardan elde edilen kuzularda kontrol grubuna göre tetanoz toksinine karşı daha yüksek düzeyde titre elde edilmiştir. Yemle birlikte E vitamini takviyesinin de benzer bir etki meydana getirdiği ancak Se ve E vitamini birlikte verildiğinde eklemeli bir etki meydana gelmediği bildirilmiştir (186).

Köpek yavrularında diyete antioksidan olarak E vitamini (500 IU/kg), vitamin C (70 mg/kg), β-karoten (0,4 mg/kg) ve Se (0,8 mg/kg) kombinasyonun tatbik edilmesinin canine distemper virüs (CDV) ve canine parvovirüs (CPV) aşılamalarına karşı bağışıklık cevabı ve yardımcı T hücrelerinin sayılarında artışa neden olduğu sonuçta enfeksiyona karşı daha uzun bir koruma sağladığı tespit edilmiştir (187).

Kuzularda, yeme ilave edilen Se ve E vitamininin PI3V'ye karşı bağışıklık cevabı güçlendirdiği tespit edilmiştir. İmmunglobulin M (IgM) konsantrasyonlarının, Se ilave edilen kuzularda sonraki 35 gün boyunca yüksek seyrettiği tespit edilmiştir. İlk inokülasyonda sadece Se ile takviye edilen kuzularda PI3V'ye karşı daha yüksek titreler elde edilirken, sadece E vitamini ile takviye edilen kuzularda ikinci PI3V inokülasyonunda daha yüksek titre meydana gelmiştir. Çalışmanın sonucunda Se ve E vitamininin birbirinden bağımsız bir şekilde bağışıklığı tetiklediği, eklemeli bir etki tespit edilmediği ileri sürülmüştür (188).

Koyunlardan alınan alyuvar hücreleri ile yapılan tehdide karşı, Se ilave edilmeyen grupla karşılaştırıldığında, Se ilave edilen farelerde daha yüksek antikor titreleri elde ediliştir (189). Koyun alyuvarlarına karşı oluşan primer bağışıklık cevabı farelere 3 µg ile 5 µg Se solüsyonunun intraperiton yoldan enjekte edilmesi ile yükseltilebildiği, bu yükselmenin Se'nin antijen tehdidi yapılmadan önce veya antijen tehdidi ile birlikte verilmesiyle en yüksek düzeyde elde edilebileceği bildirilmiştir (190). Bununla birlikte toksik düzeyde Se ilavesinin farelerde, koyun alyuvar hücrelerine karşı (189) ve civcivlerde *S. gallinarum* enfeksiyonuna karşı bağışıklık cevabında düşmeye neden olduğu bildirilmiştir (191).

Selenyum ve E vitamininin diyete normal konsantrasyonlarının üzerinde ilavesinin çeşitli türlerde bağışıklık sistemini uyarıcı etkisi olduğu bildirilmiştir. E vitamini ve Se eksikliğinin özellikle hücresel bağışıklığın baskılanmasıyla sonuçlandığı belirlenmiştir. Oral olarak E vitamini ilavesinin bağışıklık üzerindeki baskılayıcı etkiyi ortadan kaldırdığını, Se'nin ise herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (192)

Bauersachs ve ark. (193), tarafından sıçanlarda E vitamini ve Se takviyesinin humoral bağışıklığı etkileyip etkilemediği çalışılmış, Se eksikliğinin IgG değerlerinde azalmaya yol açtığı, IgA'da değişme meydana gelmediği tespit edilmiştir. Uzun süre Se eksikliği ve beraberinde E vitamini eksikliği meydana getirilen grupta IgM kayda değer bir şekilde düşük bulunmuştur.

Tüm hücre zarlarında bulunan, yağda çözünür antioksidan olan E vitamini bağışıklık sisteminin düzgün çalışması için önemli bir besin öğesidir. Hayvan deneylerinde E vitamini eksikliğinin önemli bağışıklık sistemi bozuklukları meydana getirdiği tespit edilmiştir. Normal beslenme değerinden daha fazla miktarda E vitamini takviyesinin bağışıklık cevabı arttırdığı bildirilmiştir. Çoklu doymamış yağ asitlerinin yüksek düzeyde bulunmasının bağışıklık sistemini baskıladığı, E vitamini bu baskılamanın üstesinden gelebildiği ifade edilmiştir. Yüksek düzeyde C vitamini mevcudiyeti E vitaminin doku seviyelerinin korunmasında ve dolayısıyla E vitaminin bağışıklığı geliştirici etkisini koruduğu bildirilmiştir (194, 195).

E vitamini eksikliğinde bağışıklık sistemi fonksiyonlarında düşüş meydana gelmekte, bu durum soncunda enfeksiyöz hastalıklarda ve tümör görülme oranında artışa neden olmaktadır. Yaşlanma ve AIDS ile bağışıklıkta meydana gelen zayıflama E vitamini takviyesiyle kayda değer ölçüde güçlendirilebilmektedir. E vitamini, ergin olmayan T hücrelerinin timusta olgunlaşmasında önemli bir rol oynar. E vitamini eksikliğinde T hücrelerinin dönüşümünde gerileme kaydedilmiştir. E vitamini ilavesinin timus epitel hücreleri tarafından T hücrelerinin farklılaşmasını hızlandırdığı ifade edilmiştir (196).

Venezüella equine ensefalomiyelitis virüsü ile immünize edilen kobaylara dl-alfa-tokoferil asetat formu ile beslenmesin bağışıklığı yükseltmediği bildirilmiş, dl-alfa-tokoferil enjeksiyonun ise hemaglütinin titrelerinde yükselmeye neden olduğu tespit edilmiştir (197). *E. coli* ile enfekte edilen ve beslenme düzeylerinin üzerinde E vitamini ile takviye edilen civciv ve palazlarda ölüm oranın düştüğü ve hemaglütinin titrelerinde yükselme meydana geldiği bildirilmiştir (198). E vitamini ile beslenen ve *Chlamydia* ile tehdide maruz bırakılan koyunlarda kilo artışı meydana geldiği tespit edilmiştir (199).

Nemec ve ark. (161), Se ve E vitaminin, tek veya kombine olarak, sığır diyetinde tavsiye edilen normal seviyelerde ilavesinin, *B. abortus* S-19 suşu ile aşılamayı takiben anti-*B-abortus* IgG altsınıflarını veya IgM seviyelerinde bir değişmeye yol açmadığını bildirmişleridir.

Enfeksiyöz bovine rhinotracheitis virüsü (IBRV) ile tehdide tabi tutulan buzağılarda E vitamini ve Selenyumun bağımsız olarak bağışıklığı uyardığı, hemaglutinin titrelerinin yükselmesinde sinerjik bir etki meydana getirdikleri bildirilmiştir (200). Smith ve ark. (201), Se takviyesinin süt ineklerinin klinik mastitisinde somatik hücre sayısını azalttığını, mastitis insidens ve süresinde azalmaya yardımcı olduğu bildirilmiştir. E

vitamini uygulamasının Se'nin bu etkilerini güçlendirdiği belirlenmiştir. Yazarlar, Se'nin tek başına semptomların süresini % 46 oranında kısalttığını buna rağmen E vitamininin ise mastitis semptomları süresini % 44 oranında azalttığını, Se ve E vitamini kombinasyonun bu süreyi % 62 oranında azalttığını bildirmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada ise Se noksanlığına, yeterli vitamin düzeyine sahip kuzuların *S. dublin* aşısına karşı güçlü bir antikor cevabı meydana getirdiği ve baryum selenat enjeksiyonun titrede çok ufak bir yükselme meydana getirdiği belirtilmiştir (202).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Çalışma materyali olarak, Kayseri İli Pınarbaşı İlçesi Avşarpotuklu Mahallesi yaylasında (1850m rakım) yetiştirilen, sağlıklı, 2 aylık, 40 adet, dişi, Akkaraman ırkı kuzu kullanıldı. Çalışmaya daha önce KLA'ya karşı aşılanmamış kuzular dahil edildi.

3.2. Yöntem

Çalışma kapsamına alınan hayvanlar, her biri 10 hayvandan oluşan rastgele 4 eşit gruba ayrıldı: Grup I: Kontrol, Grup II: Aşı, Grup III: E vitamini+Se, Grup IV: Aşı + E vitamini + Se. Grup I'e % 0,09 NaCl solüsyonundan 2 ml deri altı yolla uygulandı ve bu grup kontrol grubu olarak ayrıldı. Grup II'ye bakterin ve toksoid içeren detoksifiye ve purifiye aşıdan (Case-Bac®, Colorado Serum Co. Amerika Birleşik Devletleri) koltukaltı bölgesinden deri altı yolla 2 ml dozunda uygulandı. Grup III'deki kuzulara, sadece Se ve E vitamini içeren (Selejject®, Bremer Pharma Gmbh, Almanya) solüsyondan 1 ml (100 mg vitamin E asetata eşdeğer 100 I.U. Vitamin E ve 1,03 mg saf selenyuma eşdeğer 3,0 mg sodyum selenit / 1 ml çözelti) koltukaltı bölgesinden deri altı yolla uygulandı. Grup IV'deki hayvanlara 2 ml Case-Bac® aşısı ile Se ve E vitamini içeren solüsyondan koltuk altı bölgesinden deri altı yolla 1 ml dozunda uygulandı. Hayvanlar çalışma boyunca aynı bakım ve beslenme şartlarında tutuldular.

3.2.1. Kan Örneklerinin Alınması ve İşlenmesi

Gruplarda bulunan tüm hayvandan uygulama öncesi 0. günde ve uygulamadan sonraki 21.günde *Vena jugularis* yoluyla lityum herparinli ve kuru tüplere kan örnekleri alındı. Örnekler Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Laboratuvarında 3000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilerek serum ve plazmalarına ayrıldı. Lityum heparinli tüplere fosfat tampon eklenerek hafifçe vorteks edildi, ardından 2000 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Fosfat tampon ve eritrosit üzerindeki lökosit ve trombosit tabakası otomatik pipet yardımıyla alındı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Yıkama işleminden sonra ependorf tüpü içine eritrosit tabakasından 0,5 ml alındı, üzerine eşit hacimde fosfat tampon eklenip hafifçe karıştırıldı. Hazırlanan serum, plazma ve eritrosit örnekleri analiz zamanına kadar -80°C 'de saklandı.

3.2.2. Eritrositlerin Hemoliz Edilmesi

Eritrosit numuneleri analiz öncesi oda ısısında tutularak çözdürüldü. Oda ısısındaki eritrosit örneklerinden otomatik pipet yardımıyla 0,8 ml alındı ve üzerine 3,2 ml soğuk distle su ilave edilip hızla karıştırılarak eritrositler hemolize edildi. Elde edilen hemolizat, hemoglobin (Hb), CAT ve GSH-Px aktivitesi ölçümü için kullanıldı. Hemolizatın 300 ml alınarak ayrı bir ependorf tüpüne konuldu üzerine 1200 ml kloroform-etanol karışımı (3:5 oranında hazırlanmış) ilave edildi. Tüpler 30 saniye vortekslendi, ardından 3000 devirde 10 dakika santrifüj edildi ve üst kısım SOD aktivitesi ölçümü için kullanıldı.

3.2.3. Eritrosit Hemoglobin Düzeyi Ölçümü

Eritrosit Hb düzeyi ölçümü için, Fairbanks ve Klee (203) tarafından bildirilen yöntem kullanıldı.

3.2.3.1. Testin Prensibi

Testin prensibi siyanomethemoglobin oluşumunun ölçülmesine dayanmaktadır.

3.2.3.2. Testin Yapılışı

0,2 g $K_3Fe(CN)_6$, 0,05 g KCN ve 1,0 g $NaHCO_3$ tartılarak 1 litrelik behere konuldu. Elde edilen hacim deiyonize su ile 1 litreye tamamlanarak Drabkin reaktifi hazırlandı. 6 ml Drabkin reaktifi üzerine 40 µl hemolizat eklendi ve 5 dakika bekletildi.

3.2.3.3. Sonuçların Okuması ve Yorumlanması

Ölçümler kör Drabkin reaktifine karşı spektrofotometrede 540 nm absorbansta gerçekleştirildi. Sonuçlar mgHb/ml hemolizat şeklinde ifade edildi. Eritrosit Hb düzeyi SOD, GSH-Px ve CAT değerlerinin ölçülmesinde kullanıldı, antioksidan enzim aktiviteleri U/mg hemoglobin şeklinde ifade edildi.

3.2.4. Plazma Malondialdehit Ölçümü

Plazma MDA ölçümü, Yoshioka ve ark. (204), tarafından bildirilen yönteme göre yapıldı.

3.2.4.1. Yöntemin Prensibi

Yöntemin prensibi, MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan pembe rengin spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanmaktadır.

3.2.4.2. Testin Yapılışı

Gruplardan elde edilen plazma numunelerinden 0,5 ml alınarak üzerine 2,5 ml % 20' lik triklorasetik asit (TCA) ilave edildi. Kör tüpüne 3 ml TCA koyularak aynı miktarda TBA ilave edildi. Tüplerin ağızları sıkıca kapatılıp kaynar su banyosunda 30 dakika tutulduktan sonra tüpler soğutuldu ve 4 ml n-butanol ilave edilerek vortekslendi. Vorteks işleminden sonra tüpler santrifüj edildi.

3.2.4.3. Sonuçların Okuması ve Yorumlanması

Santrifüj işlemini takiben üstte kalan n-butanol tabakası alınarak 535 nm'de köre karşı okuma işlemi gerçekleştirildi. Spektrofotometrede elde edilen absorbans değerleri, önceden 1,1,3,3 tetraetoksipropanla hazırlanmış standart eğrisinde yerine konularak hesaplandı.

3.2.5. Eritrosit Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Ölçümü

Eritrosit SOD aktivitesinin ölçülmesi için Sun ve ark. (205) tarafından bildirilen yöntem kullanıldı.

3.2.5.1. Yöntemin Prensibi

Süperoksit radikallerinin ortamda bulunan nitroblutetrazoliumu indirgemesinin numunede bulunan SOD tarafından engellenmesi. Renksiz nitrobluetetrazoliumkloridin (NBT) iyonu, süperoksit radikali ile indirgendiğinde maksimum absorbansı 560 nm'de

veren mavi renkli formazona dönüşmekte ve bu reaksiyon sırasında numunedeki SOD aktivitesi ile orantılı olarak bir absorbans düşmesi gözlenmektedir.

3.2.5.2. Testin Yapılışı

23 mg ksantin 5 ml 0,1 M NaOH çözeltisi içinde çözdürülerek hacim deiyonize su ile 50 ml'ye tamamlandı. Kloroform-Etanol hemolizatı hazırlamak için 0,5 ml eritrosit hemolizatı üzerine 0,5 ml kloroform/etanol karışımı ilave edilerek, 3000 devirde, +4 C^{o}'ye ayarlı soğutmalı santrifüjde 10 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan berrak kısım analizlerde kullanıldı. Analizler, eritrosit hemolizatının 3:5 v/v oranında hazırlanan kloroform/etanol karışımıyla hazırlanan ekstraktlarda yapıldı. Test için 5 ml'lik cam tüplere 2,45 ml SOD reaktif karışımı üzerine 50 µl ksantin oksidaz çözeltisi eklenerek 25°C'lik su banyosunda 20 dakika bekletildi. Daha sonra, 1,0 ml $CuCl_2$'den ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Ölçümler 560 nm absorbansta gerçekleştirildi.

3.2.5.3. Sonuçların Okuması ve Yorumlanması

Gruplardaki hayvanlardan elde edilen sonuçlar kör ile oluşturulan regresyon eğrisine göre U/mgHb cinsinden hesaplandı.

3.2.6. Eritrosit Katalaz Aktivitesi Ölçümü

Eritrosit CAT aktivitesinin belirlenmesi için, Luck (206) tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı.

3.2.6.1. Yöntemin Prensibi

Eritrosit CAT aktivitesinin belirlenmesi yöntemin prensibi hidrojen peroksidin numunede bulunan katalaz ile yıkımlanmasıdır.

3.2.6.2. Testin Yapılışı

Bir litre balon jojeye 3,522 g KH_2PO_4 ve 5,7968 g Na_2HPO_4 eklenerek bir miktar deiyonize su içinde çözdürüldü. Elde edilen hacim deiyonize su ile 1 litreye tamamlanarak fosfat tamponu (50 mmol, pH: 7,0) hazırlandı**.** 100 ml fosfat tamponu üzerine 0,13 ml % 35'lik H_2O_2 çözeltisi ilave edildi. Çözeltinin 240 nm'de fosfat tampona karşı okunan absorbansı 500'e ayarlanarak H_2O_2 çözeltisi (10 mmol/L) elde edildi. Spektrofotometrenin kör küvetine 2,95 ml fosfat tamponu konuldu ve üzerine 50 µl hemolizat ilave edildi. Numune küvetine ise fosfat tamponda hazırlanmış hidrojen

peroksit çözeltisinden 2,95 ml konuldu ve üzerine 50 µl hemolizat ilave edildi. Küvetlerdeki sıfırıncı ve 45. saniye absorbansları köre karşı okundu.

3.2.6.3. Sonuçların Okuması ve Yorumlanması

Hesaplamalar 0. ve 45. saniyedeki absorbanslardaki düşüşlerden hareketle U/mgHb cinsinden yapıldı.

3.2.7. Eritrosit Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi Ölçümü

Eritrosit GSH-Px aktivitesi ölçümü için, Paglie ve Valentie (207) tarafından bildirilen yöntem kullanıldı.

3.2.7.1. Yöntemin Prensibi

GSH-Px ile GSH'ın t-bütil hidroperoksit (t-BOOH) varlığında GSSG'ye oksidasyonu gerçekleşir. Yöntemin prensibi, gerçekleşen bu oksidasyon sonucu oluşan GSSG'nin GSH-Rd enzimi ile tekrar GSH'ye indirgenmesi tepkimesinde NADP'ye oksitlenen NADPH'nin 366 nm dalga boyundaki absorbans değeri farkının zamana karşı okunması prensibine dayanır

3.2.7.2. Testin Yapılışı

Kör ve numune tüplerine 1 ml fosfat tampon, 0,1 ml EDTA, 0,1 ml NaN_3, 0,1 ml $NADPH+H^+$, 0,1 ml GSH, 0,2 ml aktivitesi ayarlanmış GRH-Rd katıldı. Numune tüplerine 0,2 ml hemolizat, kör tüpüne 0,2 ml fosfat tampon ilave edilerek tüpler 2-3 dakika 37°C' su banyosunda bekletildi. Üzerine 0,2 ml t-BOOH çözeltisi ilave edilerek okuma işlemi gerçekleştirildi. 0,2 ml hemolizat üzerine 0,2 ml t-BOOH çözeltisi ilave edilerek 366 nm'de 1 dakikada gerçekleşen absorbans düşüşü kaydedildi. İşlemler hem numune konulan hem de numune içermeyen örneklerde yapıldı.

3.2.7.3. Sonuçların Okuması ve Yorumlanması

GSH-Px aktiviteleri numune içeren ve içermeyen küvetlerdeki köre karşı absorbans düşüşü farklarından hareketle U/mgHb cinsinden ifade edildi.

3.2.8. Plazma Nitrik Oksit Aktivitesinin Ölçülmesi

Plazma NO aktivitesinin belirlenmesi Tracey ve ark. (208) tarafından bildirilen yönteme göre yapıldı.

3.2.8.1. Yöntemin Prensibi

Griess reaksiyonu, nitrit iyonlarına duyarlı olduğundan, ortamdaki nitratın nitrite indirgenmesi *in vivo* olarak oluşan NO'nun gerçeğe yakın miktarlarda ölçümüne olanak tanır. Bu yöntemin prensibi asidik solüsyon içerinde sülfanilikasitin nitratla reaksiyona girerek, diazonium tuzuna dönüşmesine, Diazonium tuzunun daha sonra N-(1-naphthyl) etilendiamin (NED) ile birleşerek mor renkli azo rengi meydana gelmesi ve bu rengin 547 nm absorbansta spektrofotometre ile ölçümüne dayanır.

3.2.8.2. Testin Yapılışı

Ependorf tüpleri içine sırasıyla plazma (25 µl), NADPH (8 µl), FAD (1 µl), 20 mMol'lük fosfat tampon (126 µl), nitrat redüktaz (40 µl) kondu ve vortekslendi. Tüpler 37°C 'de 20 dakika inkübe edildi. Süpernatantların 50 µl'si ELISA mikropleytlerine alındı. Kuyucukların üzerine 50 µl Griess Reaktifi ilave edildi. Mikropleyt oda ısısında ve karanlıkta 10 dakika bekletildi. Bekletme işleminden sonra örnekler spektrofotometrede 540 nm'de köre karşı okundu.

3.2.8.3. Sonuçların Okuması ve Yorumlanması

Sonuçlar, değişik konsantrasyonlarda $NaNO_3$ ile hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre mol/mg protein şeklinde hesaplandı.

3.2.9. İmmunglobulin G Antikorlarının ELISA İle Tespit Edilmesi

Kan numunelerinde KLA antikorlarının tespit edilmesi amacıyla ELITEST CLA # CK105A test kiti kullanılmıştır (HYPHEN BioMed, Fransa). Test bu kitin kullanma kılavuzunda bildirilen şekilde yapılmıştır.

3.2.9.1. Testin Prensibi

Antijen-Antikor bağlanmasından yararlanılarak, antikora bağlanmış bir enzim ve bu enzime bağlanma kabiliyetinde olan substratın reaksiyonundan kaynaklanan rengin spektrofotometrede okunmasına dayanır.

3.2.9.2. Testin Yapılışı

Mikropleyt kuyucuları yüksek düzeyde saflaştırılmış rekombinant FLD (rFLD) antijenleri ile kaplanmıştır. Test numunesinden kuyucuklara inkübe edilerek, numunede bulunan spesifik rFLD antikorlarının katı fazı oluşturan hareketsiz antijenlerle bağlanması sağlandı. Daha sonra bu kuyucuklar yıkandı. Ardından,

horseradishperoksidaz (HRP) ile işaretlenmiş fare monoklonal anti-keçi/koyun IgG antikoru (sekonder antijen) kuyucuklara ilave edildi ve yıkama işlemi gerçekleştirildi. Numunede anti-FLD antikorları mevcut olduğunda kuyucuklara kaplanan antijenler bağlandı ve bu antikorlar sekonder antikorla tespit edildi. HRP substrat ile inkübasyondan sonra test kuyucuklarında mavi bir renk oluştu. Daha sonra sülfürik asit ilave edildiğinde sarı renk değişimi meydana gelecektir. Serum numunesinde anti-FLD antikorları yoksa HRP ile işaretlenmiş sekonder antikor ile bağlanma olmadığında renk gelişmedi.

3.2.9.3. Sonuçların Okuması ve Yorumlanması

P=pozitif kontrollerin absorbans ortalaması, N=negatif kontrollerin ortalama absorbansı, S=test numunesinin ortalama absorbansı olmak üzere; test sonuçları için cut-off değeri [(P-N)/4] + N şeklinde hesaplandı. S < [(P-N)/4] + N olduğunda örnek anti-FLD antikorları yönünden negatif, S ≥ [(P-N)/4] + N olduğunda, numunenin pozitif olduğuna karar verildi. Optik dansite değerleri IgG değerlerinde meydana gelen değişmelerin yorumlanmasında kullanıldı. Test 18-25°C aralığında yapıldığında, boş absorbans değerleri < 0,100, negatif absorbans değeri < 0,20, gri alan (zayıf pozitif değerleri kapsar) 0,20-0,50, pozitif absorbans değeri > 0,50 olarak kabul edildi.

3.2.10. İstatistiksel Analiz

Çalışmadaki verilerin istatistiksel önemliliklerinin analizinde, Genel Doğrusal Model-Tekrarlı Ölçümlerde Varyans Analizi kullanıldı. Çalışmada veriler aritmetik ortalama ve standart sapma ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$) olarak ifade edildi ve P<0.05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analizlerde SPSS 13.00 istatistik programı kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Malondialdehit

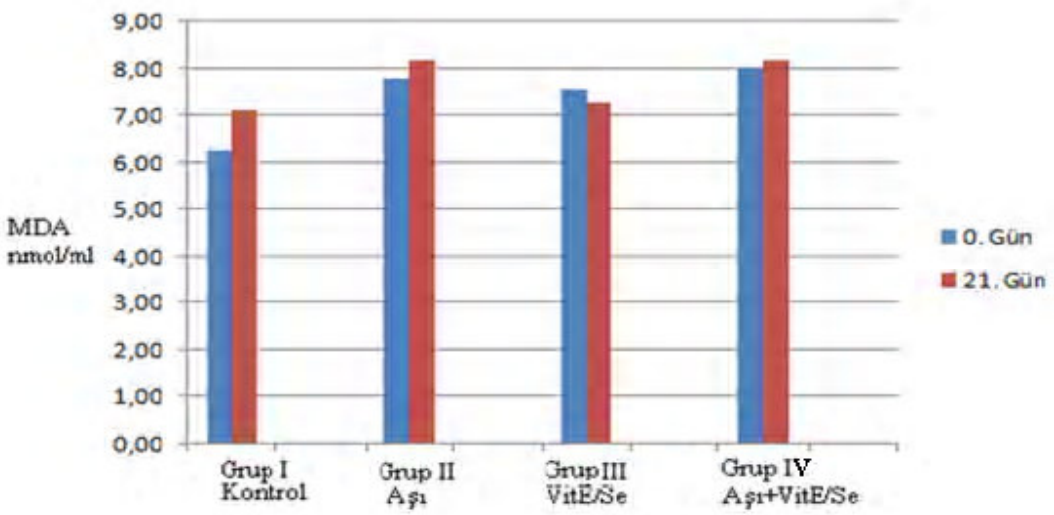
Aynı gün içinde, gruplar arası ortalamalar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bir fark tespit edilmedi (P=0,312; F=1.23). Grupların 0.gün ile 21.gün ortalama değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bir değişim tespit edilmedi (P=0,34; F=1.14). Tüm gruplardaki hayvanlardan elde edilen MDA sonuçlarının aritmetik ortalamaları ile gruplar ve günler arası farklılıkların istatistiksel önemi Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. MDA değerlerinin gruplar ve günlere göre istatistiksel önem kontrolü

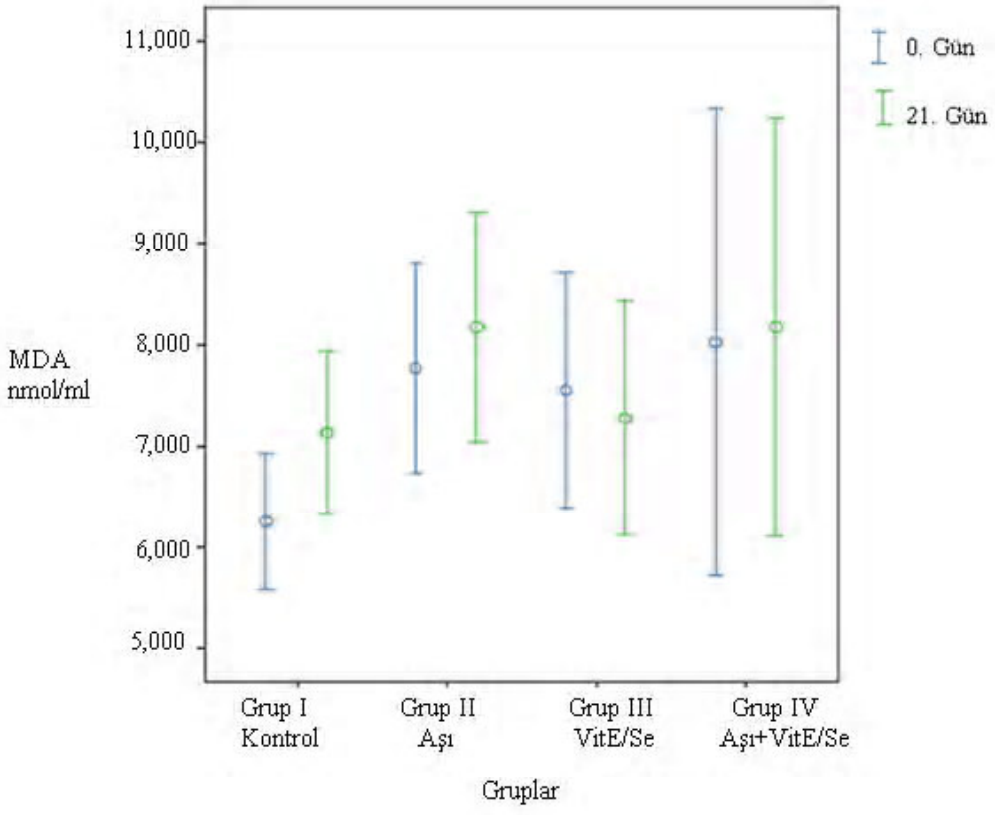
	Grup	n	0.Gün	21.Gün
			$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$
MDA nmol/ml	Grup I Kontrol	10	$6,256 \pm 0,299^{Aa}$	$7,136 \pm 0,354^{Aa}$
	Grup II Aşı	10	$7,771 \pm 0,457^{Aa}$	$8,176 \pm 0,501^{Aa}$
	Grup III VitE+Se	10	$7,554 \pm 0,514^{Aa}$	$7,279 \pm 0,511^{Aa}$
	Grup IV Aşı+VitE+Se	10	$8,028 \pm 1,02^{Aa}$	$8,176 \pm 0,912^{Aa}$

^{A}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasında fark önemli bulunmuştur.

^{a}: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler arasında fark önemli bulunmuştur.



Şekil 4.1.1. MDA değerlerinin gruplar ve günlere göre dağılımı



Şekil 4.1.2. MDA değerlerinin grup ve günlere göre Error-Bar grafiği

4.2. Süperoksit Dismutaz

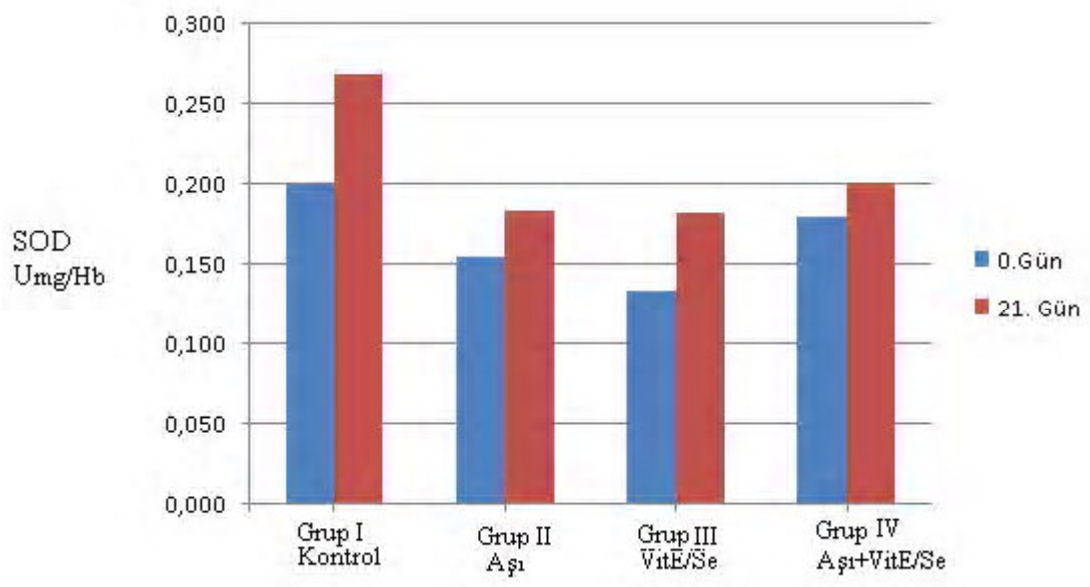
Grupların 0.gün ile 21.gün ortalama değerleri karşılaştırıldığında, Grup I'de güne göre meydana gelen artış istatistiksel olarak önemli bulundu (P=0,021; F=5,801). Aynı gün içinde, gruplar arası ortalama açısından, Grup I'de diğer gruplara göre tespit edilen artış önemli bulundu (P=0,013; F=4.124). Tüm gruplardaki hayvanlardan elde edilen SOD sonuçlarının aritmetik ortalamaları ile gruplar ve günler arası farklılıkların istatistiksel önemi Tablo 4.2.'de verilmiştir.

Tablo 4.2. SOD değerlerinin gruplar ve günlere göre istatistiksel önem kontrolü

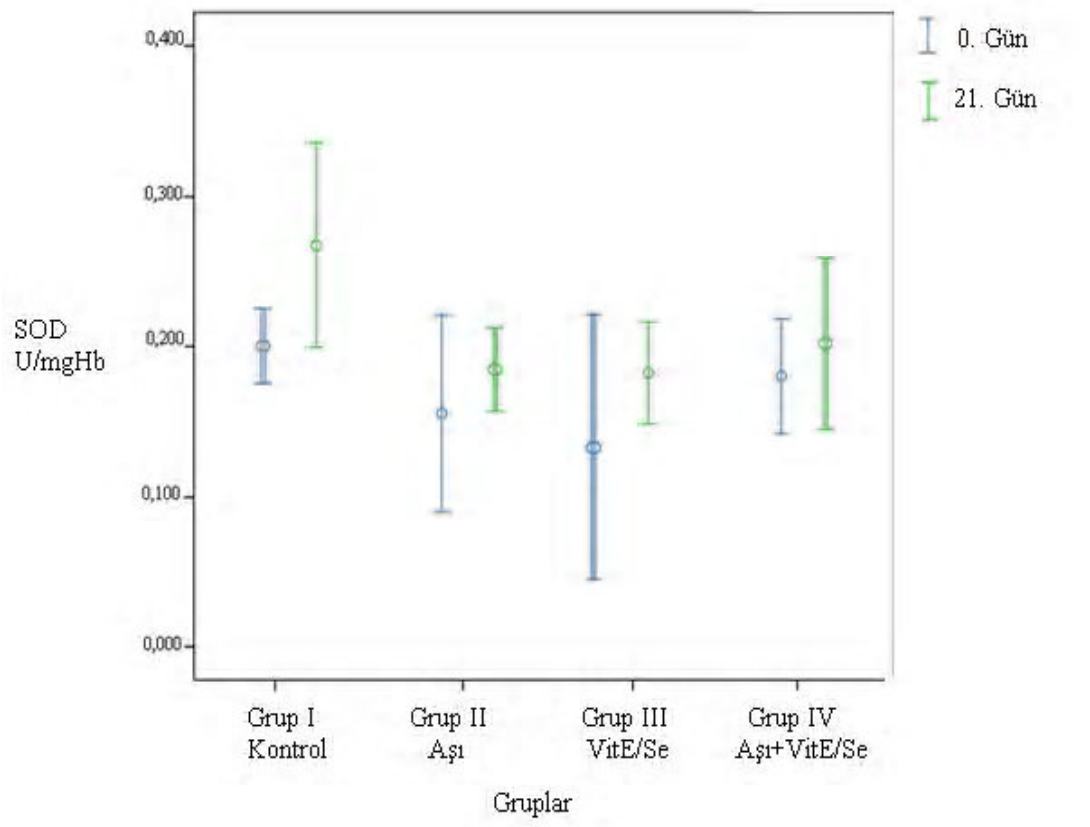
	Grup	n	0. Gün	21. Gün
			$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$
SOD U/mgHb	Grup I Kontrol	10	$0,200 \pm 0,011^{Aa}$	$0,269 \pm 0,030^{Ab}$
	Grup II Aşı	10	$0,155 \pm 0,029^{Aa}$	$0,184 \pm 0,012^{Ba}$
	Grup III VitE+Se	10	$0,133 \pm 0,039^{Aa}$	$0,182 \pm 0,015^{Ba}$
	Grup IV Aşı+VitE+Se	10	$0,180 \pm 0,016^{Aa}$	$0,201 \pm 0,025^{Ba}$

$^{A, B}$: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasında fark önemli bulunmuştur.

$^{a, b}$: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler arasında fark önemli bulunmuştur.



Şekil 4.2.1. SOD değerlerinin gruplar ve günlere göre dağılımı



Şekil 4.2.2. SOD değerlerinin grup ve günlere göre Error-Bar grafiği

4.2. Katalaz

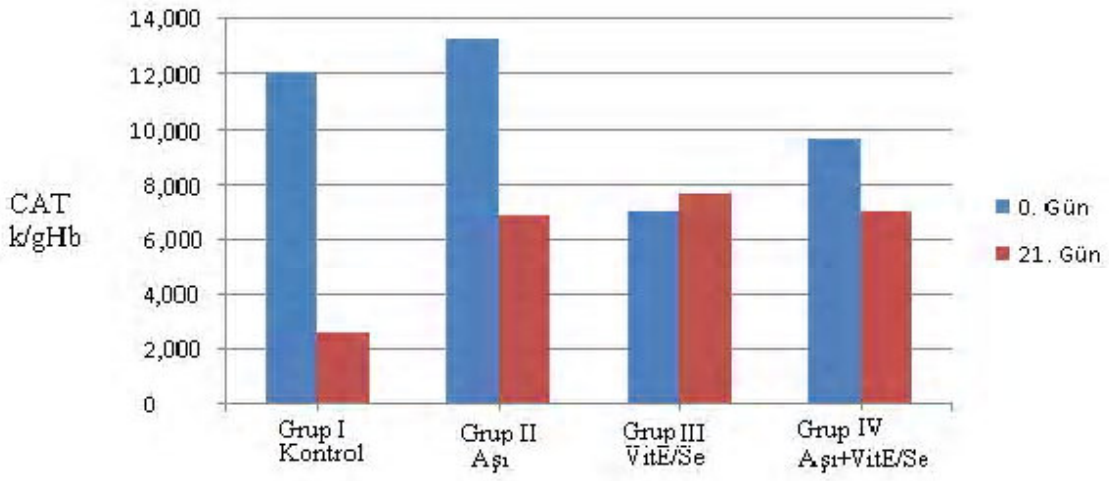
Grupların 0.gün ile 21.gün ortalama değerleri karşılaştırıldığında, Grup I, II ve IV'de güne göre meydana gelen azalma istatistiksel olarak önemli bulundu (P<0,001; F=50,25). Aynı gün içinde, gruplar arası ortalama açısından, 0. günde Grup III ile Grup I, II, IV arasında, 21. günde ise Grup I ile diğer gruplar arasındaki fark önemli bulundu (P=0,008; F=4,62). Gruplardaki hayvanlardan elde edilen CAT sonuçlarının aritmetik ortalamaları ile gruplar ve günler arası farklılıkların istatistiksel önemi Tablo 4.3.'de verilmiştir.

Tablo 4.3. CAT değerlerinin gruplar ve günlere göre istatistiksel önem kontrolü

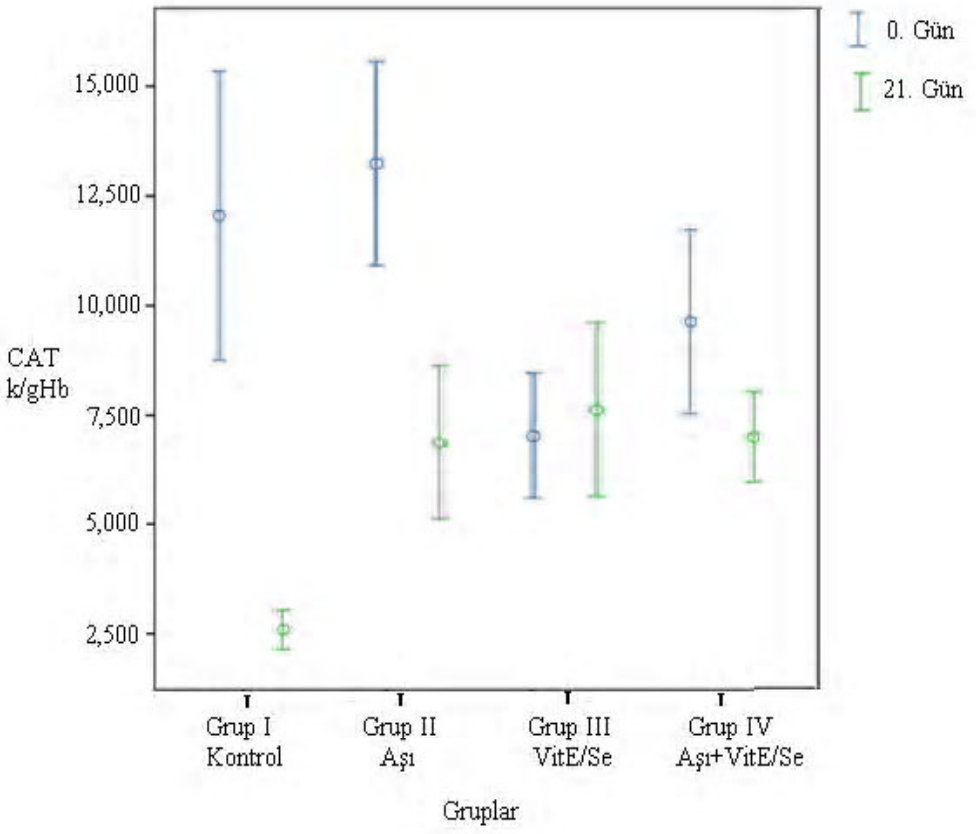
	Grup	n	0. Gün	21. Gün
			$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$
CAT k/gHb	Grup I Kontrol	10	$12,047 \pm 1,454^{Aa}$	$2,589 \pm 0,197^{Ab}$
	Grup II Aşı	10	$13,240 \pm 1,027^{Aa}$	$6,872 \pm 0,775^{Bb}$
	Grup III VitE+Se	10	$7,026 \pm 0,635^{Ba}$	$7,619 \pm 0,881^{Ba}$
	Grup IV Aşı+VitE+Se	10	$9,631 \pm 0,924^{AB\ a}$	$6,999 \pm 0,460^{Bb}$

$^{A, B}$: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasında fark önemli bulunmuştur.

$^{a, b}$: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler arasında fark önemli bulunmuştur.



Şekil 4.3.1. CAT değerlerinin gruplar ve günlere göre dağılımı



Şekil 4.3.2. CAT değerlerinin grup ve günlere göre Error-Bar grafiği

4.4. Glutasyon Peroksidaz

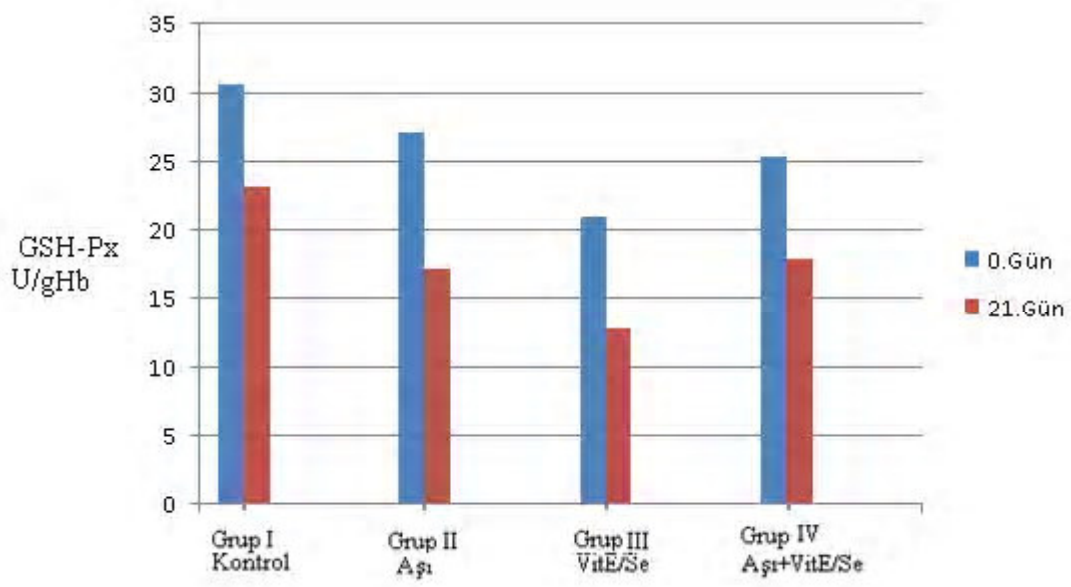
Grupların 0.gün ile 21.gün ortalama değerleri karşılaştırıldığında, Gruplarda güne göre meydana gelen azalma istatistiksel olarak önemli bulundu (P=0,002; F=10,68). Aynı gün içinde, gruplar arası ortalamalar açısından fark önemli bulunmadı (P=0,086; F=2,38). Gruplardaki hayvanlardan elde edilen GSH-Px sonuçlarının aritmetik ortalamaları ile gruplar ve günler arası farklılıkların istatistiksel önemi Tablo 4.4.'de verilmiştir.

Tablo 4.4. GSH-Px değerlerinin gruplar ve günlere göre istatistiksel önem kontrolü

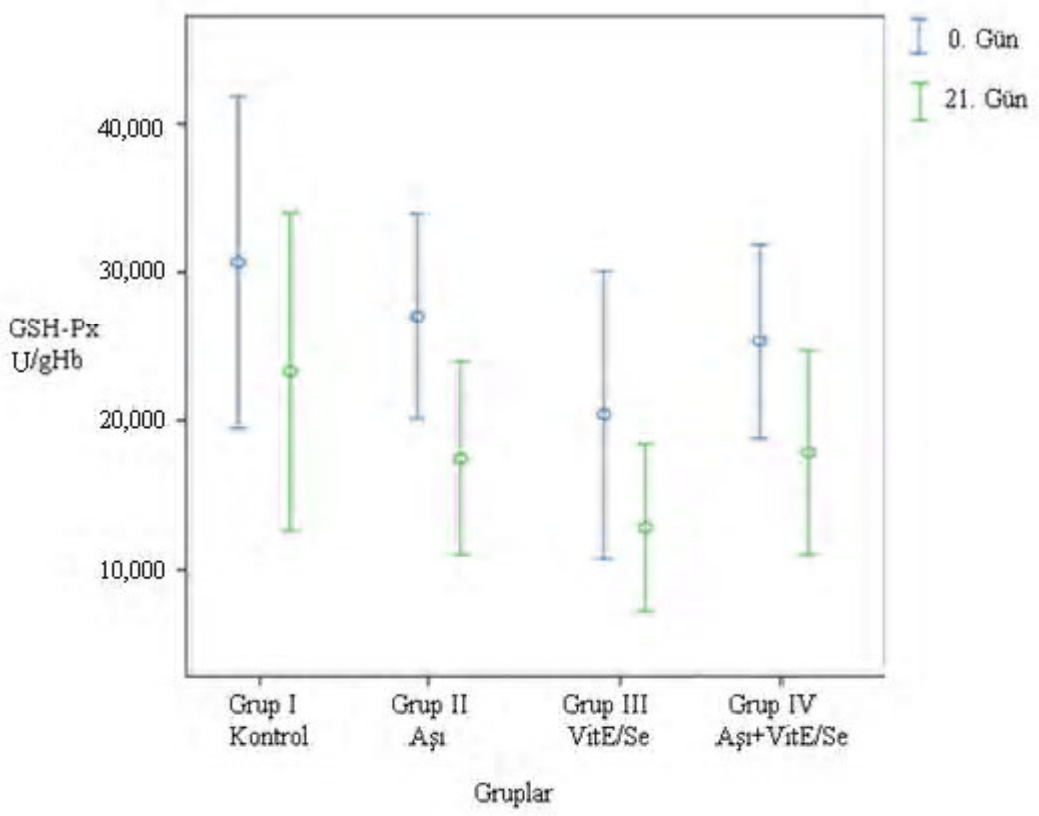
	Grup	n	0.Gün	21.Gün
			$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$
GSH-Px U/gHb	Grup I Kontrol	10	$30,536 \pm 4,94^{Aa}$	$23,182 \pm 4,73^{Ab}$
	Grup II Aşı	10	$27,027 \pm 3,05^{Aa}$	$17,220 \pm 2,87^{Ab}$
	Grup III VitE+Se	10	$20,920 \pm 4,27^{Aa}$	$12,835 \pm 2,48^{Ab}$
	Grup IV Aşı+VitE+Se	10	$25,354 \pm 2,88^{Aa}$	$17,853 \pm 3,03^{Ab}$

^{A}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasında fark önemli bulunmuştur.

$^{a, b}$: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler arasında fark önemli bulunmuştur.



Şekil 4.4.1. GSH-Px değerlerinin gruplar ve günlere göre dağılımı



Şekil: 4.4.2. GSH-Px değerlerinin grup ve günlere göre Error-Bar grafiği

4.5. Nitrik Oksit

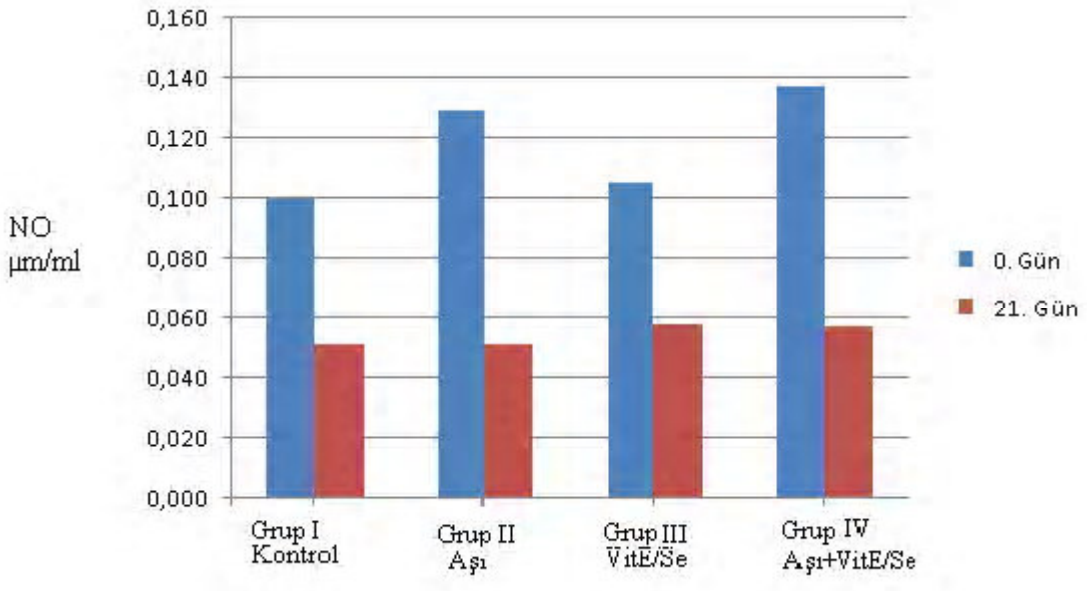
Grupların 0.gün ile 21.gün ortalama değerleri karşılaştırıldığında, tüm gruplarda güne göre meydana gelen azalma istatistiksel olarak önemli bulundu (P<0,001; F=174,67). Aynı gün içinde, gruplar arası ortalama açısından önemli bir fark bulunmadı (P=0,145; F=1,91). Gruplardaki hayvanlardan elde edilen NO sonuçlarının aritmetik ortalamaları ile gruplar ve günler arası farklılıkların istatistiksel önemi Tablo 4.3.'de verilmiştir.

Tablo 4.5. NO değerlerinin gruplar ve günlere göre istatistiksel önem kontrolü

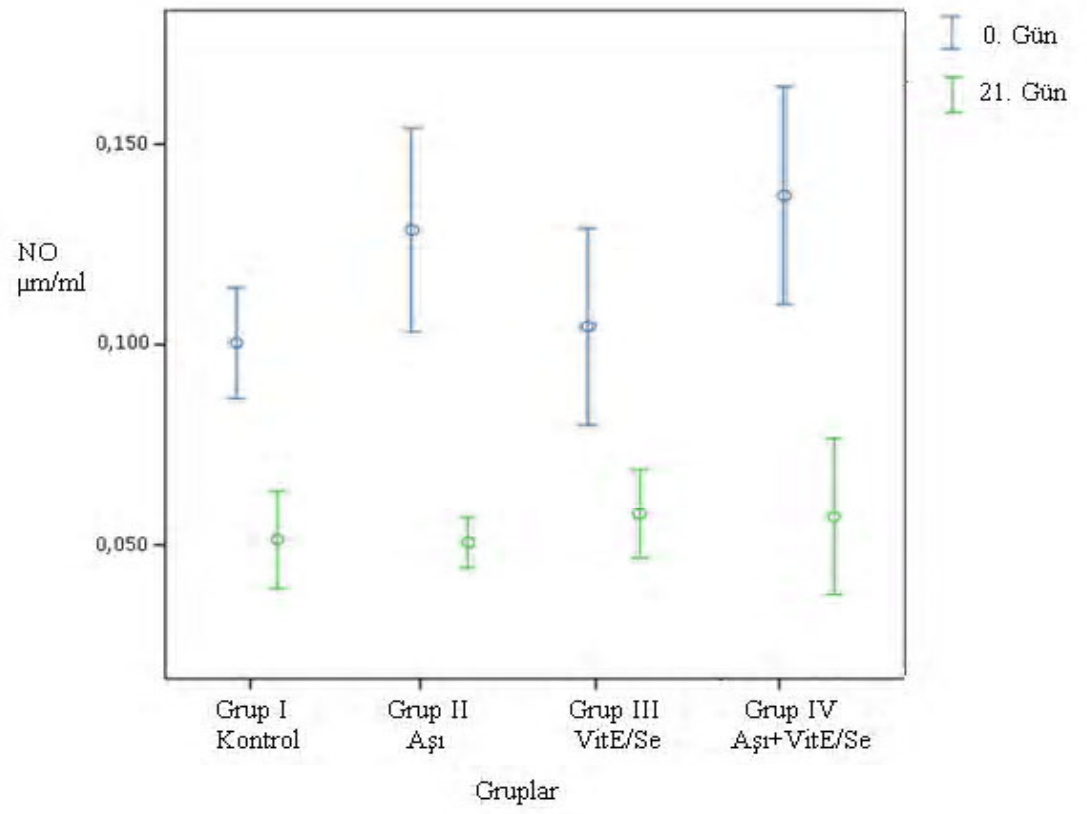
	Grup	n	0. Gün	21. Gün
			$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$
NO µm/ml	Grup I Kontrol	10	0,100±0,006^{Aa}	0,051±0,005^{Ab}
	Grup II Aşı	10	0,129±0,011^{Aa}	0,051±0,003^{Ab}
	Grup III VitE+Se	10	0,105±0,011^{Aa}	0,058±0,005^{Ab}
	Grup IV Aşı+VitE+Se	10	0,137±0,012^{Aa}	0,057±0,009^{Ab}

^{A}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasında fark önemli bulunmuştur.

$^{a, b}$: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler arasında fark önemli bulunmuştur.



Şekil 4.5.1. NO değerlerinin gruplar ve günlere göre dağılımı



Şekil 4.5.2.NO değerlerinin grup ve günlere göre Error-Bar grafiği

4.6. Kazeöz Lenfadenitis IgG ELISA sonuçları

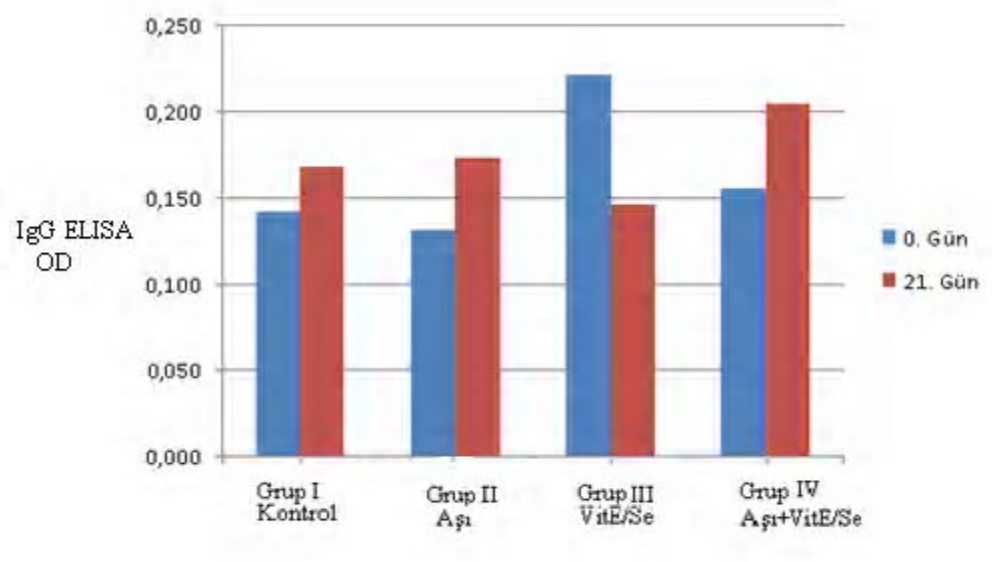
Grupların 0.gün ile 21.gün ortalama OD değerleri karşılaştırıldığında, hiçbir grupta güne göre istatistiksel olarak önemli bir değişim tespit edilmedi (P=0,881; F=0,221). Aynı gün içinde, gruplar arası ortalamalar karşılaştırıldığında, önemli bir fark tespit edilmedi (P=0,754; F=0,1). Gruplardaki hayvanlardan elde edilen KLA'ya karşı aşılama sonrası oluşan antikorların OD sonuçlarının aritmetik ortalamaları ile gruplar ve günler arası farklılıkların istatistiksel önemi Tablo 4.6.'de verilmiştir.

Tablo 4.6. ELISA OD değerlerinin gruplar ve günlere göre istatistiksel önem kontrolü

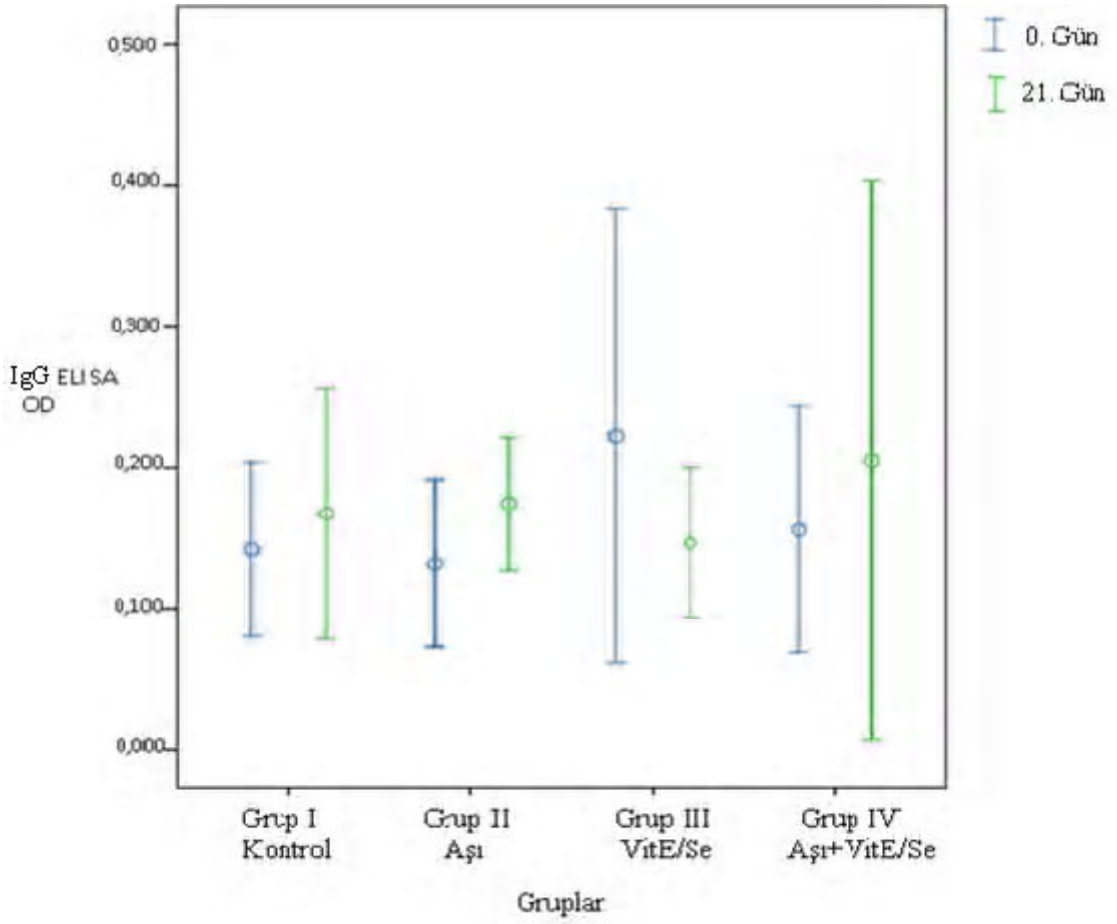
	Grup	n	0. Gün	21. Gün
			$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$
IgG ELISA OD	Grup I Kontrol	10	$0,142 \pm 0,027^{Aa}$	$0,168 \pm 0,039^{Aa}$
	Grup II Aşı	10	$0,132 \pm 0,026^{Aa}$	$0,174 \pm 0,021^{Aa}$
	Grup III VitE+Se	10	$0,222 \pm 0,071^{Aa}$	$0,147 \pm 0,024^{Aa}$
	Grup IV Aşı+VitE+Se	10	$0,156 \pm 0,039^{Aa}$	$0,205 \pm 0,088^{Aa}$

[A]: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasında fark önemli bulunmuştur.

[a]: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler arasında fark önemli bulunmuştur.



Şekil 4.6.1. IgG ELISA OD değerlerinin gruplar ve günlere göre dağılımı



Şekil 4.6.2. IgG ELISA OD değerlerinin grup ve günlere göre Error-Bar grafiği

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Tartışma

Çalışmada, KLA'ya karşı aşılanan kuzularda, aşılamayla birlikte Se ve E vitamininin kombine olarak uygulanmasının oksidatif cevap üzerine etkileri incelendi. Bu amaçla aşılama öncesi ve aşılamadan 21 gün sonra plazma MDA ve NO ile eritrosit SOD, GSH-Px, CAT düzeyleri ve KLA'ya karşı uygulanan aşı ile oluşan antikor seviyeleri belirlendi.

Literatürde MDA seviyesinin hastalık ve stres şartlarında yükseldiğinin bildirildiği pek çok çalışma olmasına rağmen (140-142), KLA hastalığında MDA düzeylerinin araştırıldığı, KLA'ya karşı aşılama sonrası MDA düzeyleri ile bağışıklık arasında ilişkinin incelendiği bir çalışma bulunamadı. Kızıl ve Gül (144), besi sığırlarında yaptıkları denemede A grubuna sadece trivalan şap aşısı (Tip A, O ve Asia 1), B grubuna şap aşısı + aşılama sırası ve sonrası 3. günde C vitamini; C grubuna şap aşısı + aşılama sırasında AD_3E vitamini ve D grubuna şap aşısı + aşılama sırası AD_3E vitamini + C vitamini ve aşılama sonrası 3. günde C vitamini uygulamışlardır. Araştırmacılar tarafından yapılan vitaminlerin antioksidan etkileri ve lipid peroksidasyon düzeyleri ile ilgili bu çalışmada, şap aşısı + aşılama sırasında AD_3E vitamini ve şap aşısı + aşılama sırası AD_3E vitamini + C vitamini ve aşılama sonrası 3. günde C vitamini uyguladıkları gruplarında 0. ile 21. gün ortalamaları karşılaştırıldığında MDA düzeylerinde meydana gelen artış önemli bulunmuştur. Kızıl ve Gül (144) tarafından yapılan çalışmada MDA değerlerinde meydana gelen yükselmenin, şap aşılaması için kullanılan aşının üç farklı suşa karşı hazırlanan attenüe aşı olması nedeniyle ROT oluşturma potansiyelinin daha

yüksek olabileceği ile ilişkili olduğu düşünüldü. Çalışmamızdaki grupların 0.gün ile 21.gün değerleri karşılaştırıldığında, güne bağlı istatistiksel olarak önemli bir değişim tespit edilmedi (P>0,05). Bunun nedeni çalışmamızda tek suş içeren inaktif bir aşı kullanılmış olması nedeniyle kullanılan aşının oksidan/antioksidan dengede önemli bir değişime yol açmadığına bağlandı.

Katalaz enzimi, H_2O_2'yi oksijen ve suya parçalar, böylece hücreleri H_2O_2'ye bağılı oksidatif hasara karşı korur (123, 148, 158, 159). Kızıl ve Gül (144) tarafından besi sığırlarında şap aşılaması sonrası vitaminlerin antioksidan etkileri ve lipid peroksidasyon düzeyleri ile ilgili yapılan çalışmada, sadece trivalan şap aşısı, şap aşısı + aşılama sırası ve sonrası 3. günde C vitamini ve şap aşısı + aşılama sırası AD_3E vitamini + C vitamini ve aşılama sonrası 3. günde C vitamini uygulanan gruplarda 0. ile 21. gün ortalamaları karşılaştırıldığında CAT değerlerinde tespit edilen artışların önemli olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda, I, II ve IV. Gruplarda CAT aktivitesinde önemli bir düşüş belirlendi (P<0,001). Çalışmamızda CAT düzeyinde aşı uygulanan gruplardaki bu düşüş, immun sistemin aktivasyonu sırasında CAT üretiminin azaldığını ya da aşılama nedeniyle oluşan oksidatif cevabın etkilerinin azaltılması için rezerv CAT enzimlerinin kullanılmış olabileceğini; CAT aktivitesindeki düşüşün Grup IV'de Grup I ve II'ye göre daha az olması ve Grup III'de düşüş olmaması ise Vitamin E ve Se kombinasyonunun CAT aktivitesindeki düşüşü azalttığını düşündürdü.

CAT enziminin, ayrıca, reaktif nitrik oksit türlerinin oluşumunu da önlediği bildirilmiştir (159). Bu çerçevede gruplarda NO düzeylerinde 0. günden 21. güne kadar geçen zamanda önemli bir düşme olması, gruplardaki CAT rezervinin NO'in etkinsizleştirilmesi için kullanılmış olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda gün içi ortalama değerler karşılaştırıldığında 0. günde CAT değerleri bakımından Grup III ile Grup I, II, IV arasındaki farkların önemli olduğu tespit edildi (P<0,05). 21. günde CAT Grup I'de diğer gruplara göre önemli derecede düşük bulundu (P<0,05). Bu durumun, çalışmada kullanılan hayvanların bir örnek olmayışları ile ilişkili olması muhtemeldir.

Süperoksit dismutaz, süperoksiti H_2O_2 ve moleküler oksijene çeviren reaksiyonu katalize eden bir enzimdir. Hücresel kompartımanlardaki O_2^- düzeyleri bu sistem sayesinde kontrol altında tutulur (148). Kızıl ve Gül (144), besi sığırlarında vitaminlerin antioksidan etkileri ve lipid peroksidasyon düzeyleri ile ilgili yapıkları çalışmada tüm

gruplarda 0 ve 21. günler arasında SOD değerinde meydana gelen azalmanın önemli olduğunu bildirmişlerdir. Subbaiah ve ark. (209), Newcastle virüs (NDV) ile enfekte tavuklarda SOD aktivitelerinin kontrol grubuna göre düşük olduğunu, NDV ile enfekte ve vitamin E takviyesi yapılan tavuklarda ise SOD değerlerinde yükselme tespit etmişlerdir. Marikovsky ve ark. (154), SOD düzeylerinin organizmada özellikle hücresel bağışıklığın meydana gelmesinde önemli rol oynadığını söylemiş, SOD enziminin, makrofajların TNF-α, IL-1 ve IL-6 gibi proinflamatör sitokinleri üretmesi sayesinde yangı süreçlerinin aktivasyonunda ve bağışıklığın düzenlenmesinde önemli görevleri olduğunu bildirmişlerdir. Hücre içi Cu/ZnSOD miktarında gerçekleşen artışın makrofajların yükselen ROT seviyeleriyle daha rahat başa çıkmasına yardımcı olduğunu ve bağışıklık cevabın artışına neden olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, Cu/ZnSOD enziminin disülfiram ile *in vivo* olarak inaktive edilebildiğini, Cu/ZnSOD inaktive edilen periton kaynaklı makrofajlarda TNF-α üretiminde azalma meydana geldiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda, 0. gün ile 21. gün sonuçları karşılaştırıldığında, grup I 'de SOD değerinde artış meydana geldiği ($P<0,05$), diğer gruplarda ise SOD değerlerinde bir değişme olmadığı tespit edildi. Kontrol grubundaki bu değişim, denemenin saha şartlarında yapılması ve gruplarının rastgele oluşturulması nedeniyle görülebilen bireysel farklılıklarla ilişkilendirildi.

Glutasyon peroksidaz enzimi yapısında Se elementi içerir. Dolayısıyla dokulardaki Se düzeyi enzimin işlevi için önemli bir unsurdur. Glutasyon peroksidaz hidrojen peroksit ve organik peroksitlerin yıkımını katalize eder (148). Kızıl ve Gül (144), şap aşısı uygulaması yaptıkları besi sığırlarında, sadece trivalan şap aşısı uygulanan A grubu; şap aşısı + aşılama sırasında AD_3E vitamini uygulanan C grubu ve şap aşısı + aşılama sırası AD_3E vitamini + C vitamini ve aşılama sonrası 3. günde C vitamini uygulanan D grubunda 0. ile 21. Gün ortalamaları arasında GSH-Px değerlerinde meydana gelen azalmanın önemli olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmamızda tüm gruplarda GSH-Px seviyelerinin zamana bağlı olarak azaldığı gözlendi ($P<0,05$). Özellikle sadece aşı uygulanan grup II'de 21. günde CAT ile birlikte GSH-Px seviyelerinde meydana gelen azalma, hayvanlarda aşıya bağlı bir oksidatif cevabın gelişmiş olabileceğini düşündürdü.

Etken konakçı hücrede fagosite olduktan sonra, konakçı hücrede meydana gelen NO'nun bakteriler üzerinde antimikrobiyel etkili olduğu, bu etkinin, NO'nun bakteride

antimikrobiyel etkilere karşı koruma mekanizmalarını harekete geçiren genlerin regülasyonunu aktive ederek bakterinin hücre içinde fagositoz mekanizmasından korunarak canlı kalmayı başarması ile ilişkisi olduğu belirtilmiştir (43). Bakterinin, makrofajların içerisinde, bakteriyel hücre zarı lipidlerinin özelliği ve bakteriye ait bazı antijenik elemanların makrofajların NO üretimini engellemesi yoluyla canlı kaldığı ifade edilmiştir (58). Ayrıca, NO lenfositlerin aşırı çoğalmasının engellenmesi ve konakçı hücrelerine karşı hasarın bastırılmasında da rol oynadığı bildirilmiştir (165).

Organizmada makrofajlar tarafından üretilen NO, virüs, bakteri, mantar, protozoa, helmint ve tümör hücrelerine karşı sitotoksik etki gösterir. NO'nun *C. neoformans*, *T. gondii*, *M. bovis* gibi birçok patojene karşı mikrobiyostatik ve mikrobisidal etki gösterdiği bildirilmiştir (173). Diğer taraftan, makrofajlar tarafından salgılanan antibakteriyel özellikler sergileyen NO'nun sadece bakteriyel ve tümör hücrelerinin tahribatına yol açmadığını, makrofajların kendilerinin ve çevredeki normal hücrelerin de hasarlanmasına ve fonksiyonlarının zayıflamasına yol açabileceği de bildirilmiştir (166). Başka bir çalışmada tüberkülozlu hastalarda dışarıya verilen nefes içerisindeki NO ölçülmüş, NO değeri düşük olan hastaların yüksek olan hastalara göre daha şiddetli bir hastalık tablosu sergiledikleri tespit edilmiştir (170). Grasemann ve ark. (171), pnömönili çocukların bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısında yüksek düzeyde NO bulunduğunu tespit etmiştir. Nisbet ve ark. (176), *B. abortus* ile enfekte sığırlarda, NO seviyesinin daha yüksek olduğunu tespit etmişler, bu yüksek NO seviyelerini bakteriyel liposakkaritler yüzünden makrofajlardaki NO üretiminin artışına bağlamışlardır.

Eggleton ve ark. (110), koyunlarda, sadece *C. pseudotuberculosis* toksoidi içeren aşıya sodyum selenit veya klostridial toksoidlerin ilave edilmesinin, sadece toksoid içeren aşı ile meydana gelen korumadan farklı bir koruma sağlamadığını tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmada, aşılamayla birlikte E vitamini+Se enjekte edilen grup IV'de diğer gruplara göre KLA IgG değerlerinde istatistik olarak önemli düzeyde bir fark tespit edilmedi Nemec ve ark. (161), Se ve E vitamininin, tek veya kombine, sığır diyetinde tavsiye edilen normal seviyelerde verilmesinin, standart *B. Abortus*s-19 suşu ile aşılamayı takiben anti-*B-abortus* IgG alt sınıflarını veya IgM seviyelerinde bir değişime yol açmadığını bildirmişlerdir. Kuzularda, *Salmonella dublin* aşısına karşı yapılan bir çalışmada ise, yemle birlikte baryum selenat uygulanmasının titrede çok ufak bir yükselme meydana getirdiği belirtilmiştir (202). Bazı çalışmalarda (186, 188), yapılan

çalışmamızda elde edilen verileri destekler nitelikte, Se ve E vitaminin birlikte verildiğinde bağışıklık değerlerinde belirgin bir etki meydana getirmediği bildirilmiştir. Çalışmalarda, bunun nedenin kullanılan Se ve vitamin E düzeyine bağlı olabileceği bildirilmiş, bazı araştırmacılara göre tavsiye edilen seviyelerden daha yüksek dozda Se ve E vitamini takviyesinin bağışıklığı daha fazla uyarabileceği bildirilmiştir (189). Leyan ve ark. (164), tetanoz toksoidi ve *B. abortus* RB51 suşu uygulanan düvelerde, Se ilavesinin deneme grubunda humoral bağışıklık değerlerinde bir yükselmeye neden olmadığını, diğer taraftan hücresel bağışıklıkta önemli bir yükselmeye neden olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda, bildirimlerle (164, 186, 188) uyumlu olarak, KLA'ya karşı bakterin ve toksoid içeren aşıyla birlikte Se ve E vitamininin kombine olarak uygulanmasının IgG değerlerinde istatistiksel olarak önemli bir değişime neden olmadığı belirlendi.

Çalışmamızda, gruplarda gün içi ve günler arası IgG sonuçları değerlendirildiğinde istatistiksel olarak önemli bir fark tespit edilmedi. Çalışmamızda aşı ile birlikte tek doz şeklide uygulanan E vitamini ve Se (100 I.U. Vitamin E ve 1.03 mg Se) kombinasyonunun ise antikor değerleri üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı belirlendi.

5.2. Sonuç ve Öneriler

Sonuç olarak; elde edilen bulgulara göre, çalışmamızda lipid peroksidasyonun önemli bir göstergesi olan MDA düzeylerinde önemli değişimler olmasa da; özellikle CAT ve GSH-Px aktivitelerindeki azalma ve SOD aktivitesindeki yükselme, aşılamanın kuzularda oksidan/antioksidan dengede bozulmaya neden olabileceğini düşündürdü. Ancak, çalışmada aşı ve antioksidanların birlikte uygulandığı saha şartlarında kuzular için enjeksiyon olarak tavsiye edilen dozlarda, antioksidan amaçla E vitamini ve Se takviyesinin MDA, SOD, CAT, GSH-Px ve NO değerlerinde önemli bir değişime yol açmadığı belirlendi. Konu ile ilgili daha detaylı bulguların elde edilmesi için kontrollü olarak ve bir örnek yetiştirilen hayvanlar üzerinde ve Vit E+Se uygulamalarının farklı doz ve sürelerde verileceği çalışmaların yapılmasının yararlı olacağı kanaatine varıldı.

6.KAYNAKLAR

1. Batey RG. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goat. Aust Vet J 1986;63:269-272.
2. Fontaine MC, Baird GJ. Caseous lymphadenitis. Small Rumin Res 2008;76:42–48.
3. Paton MW, Walker SB, Rose, IR, et al. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. Aust Vet J 2003;81:91-95.
4. Paton MW, Mercy AR, Wilkinson FC, et al. The effects of caseous lymphadenitis on wool production and body weight in young sheep. Aust Vet J 1988;65:117-119.
5. Batey RG. The effect of caseous lymphadenitis on body condition and weight of merino's mutton carcasses. Aust Vet J 1986;63:268.
6. Paton MW, Epidemiology and control of caseous lymphadenitis in Australian sheep flocks. PhD Thesis, Murdoch University, Australia, 2010:105
7. Windsor PA. Control of Caseous lymphadenitis. Vet Clin North Am Food Anim Pract 2011;27(1):193-202.
8. O'Reilly KM, Medley GF, Green LE. The control of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep flocks: a mathematical model of the impact of vaccination, serological testing, clinical examination and lancing of abscesses. Prev Vet Med 2010;95(1-2):115-126.
9. Augustine JL, Renshaw HW. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in axenic purulent exudate on common barnyard fomites. Am J Vet Res 1986;47(4):713-715

10. Guimarães AS, Carmo FB, Heinemann MB, et al. High sero-prevalence of caseous lymphadenitis identified in slaughterhouse samples as a consequence of deficiencies in sheep farm management in the state of Minas Gerais, Brazil. BMC Vet Res 2011;7:68

11. Purchase HS. An outbreak of ulcerative lymphangitis in cattle caused by *Corynebacterium Ovis*. J Comp Pathol 1944;54: 238–244

12. Neave RM. An outbreak of ulcerative lymphangitis in young heifers in Kenya. Vet Rec. 1951;63(10):185.

13. Aleman M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in horses: 538 cases (1982-1993). Am Vet Med Assoc 1996;209(4):804-809.

14. Selim AS. Edematous skin disease of buffalo in Egypt. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2001;48(4):241-258.

15. Sparke P, Gold JR. *Corynebacterium pseudotuberculosis* liver abscess in a mature alpaca (Lama pacos). Can Vet J 2012;53(4):387–390.

16. Peel MM, Palmer GG, Stacpoole AM, et al. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Report of Ten Cases from Australia and Review. Clin Infect Dis 1997;24(2):185-191.

17. Alonso JL, Simon MC, Girones O, et al. The effect of experimental infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* on reproduction in adult ewes. Res Vet Sci 1992;52(3):267-272.

18. Hard GC. Electron Microscopic examination of *Corynebacterium ovis*. J Bacteriol 1969;97(3)1480-1485.

19. Songer JG, Beckenbach K, Marshall MM, et al. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Am J Vet Res 1988, 49(2):223-226.

20. Songer JG. Bacterial phospholipases and their role in virulence. Trends Microbiol 1997;5(4):156-161.

21. Dorella FA, Pacheco LGC, Oliveira SC, et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. Vet Res 2006;37(2):201-218.

22. Collins MD, Goodfellow M, Minnikin DE, Fatty acid composition of some mycolic acid-containing coryneform bacteria, J. Gen Microbiol 1982;128(11):2503–2509.

23. Buxton A, Fraser G. Corynebacterium, In: Buxton A, Fraser G. (Eds.), Animal Microbiology, Blackwell Scientific Publications, Edinburgh, 1977:p177–183.

24. Diker KS, Akan M, Çarlı T, Yardımcı H, Şen A, Ülgen M, Sareyyüpoğlu B, Çetin C, Veteriner Mikrobiyoloji ve Epidemiyoloji, 3. Baskı, Andolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir, 2013:p53-54.

25. Merchant IA, Packer RA. The Genus Corynebacterium, In: Merchant IA, Packer RA. (Eds.), Veterinary bacteriology and virology, The Iowa State University Press, Iowa, 1967:p425–440.

26. Barakat AA, Selim SA, Atef AA. Two serotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from different animal species. 1984;3(1):151-163.

27. Biberstein AW, Linder R, Jang S. Two biotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Vet Rec 1971;89(26):691-692.

28. Costa LR, Spier SJ, Hirsh DC. Comparative molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* of different origin. Vet Microbiol 1998; 62(2):135-43.

29. Brown CC. Serological response and lesions in goats experimentally infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis* of carpine and equine origins. Am J Vet Res 1985;46:2322-2326.

30. Soucek A. Michalec C. Souckova A. Identification and characterization of a new enzyme of the group "phospholipase D" isolated from *Corynebacterium ovis*. Biochim Biophys Acta 1971;227(1):116-128

31. Muckle CA, Gyles CL. Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Can J Comp Med 1982;46(2):206–208

32. Garg DN, Nain SPS, Chandiramani NK. Isolation and characterization of *Corynebacterium ovis* from sheep and goats. Indian Vet J 1985;62:805–808.

33. Judson R, Songer JG. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: in vitro susceptibility to 39 antimicrobial agents. Vet Microbiol 1991;27(2):145-150.

34. Costa LR, Spier SJ, Hirsh DC. Comparative molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* of different origin. Vet Microbiol 1998;62(2):135-43.

35. Hodgson ALM, Krywult J, Corner LA, et al. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle, Infect Immun 1992;60(7):2900–2905.

36. McNamara PJ, Bradley GA, Songer JG. Targeted mutagenesis of the phospholipase D gene results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Mol Microbiol 1994;12(6):921-930.

37. Carne HR, Wickham N, Kater JC. A toxic lpid from the surface of *Corynebacterium ovis*. Nature 1956;178:701-702.

38. Muckle CA, Gyes CL. Relation of lipid content and exotoxin production to virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in mice. Am J Res 1983;44(6):1149-1153.

39. Billington SJ, Esmay PA, Songer JG, et al. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. FEMS Microbiol Lett 2002;208(1):41-45.

40. Jansen BC. The epidemiology of bacterial infection of the genitalia in rams. Onderstepoort J Vet Res 1983;50(4):275-282.

41. Nairn ME, Robertson JP. Corynebacterium infection of sheep: role of skin lesions and dipping fluids. Aust Vet J 1974;50(12):537-542.

42. İzgür M, Akan M, İlhan Z. Koyunlarda kazeöz lenfadenitis olgularından izole edilen etkenler. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1999;46:43-50.

43. Sutherland SS, Paton MW, Mercy AR, et al. A reliable method for establishing caseous lymphadenitis infection in sheep. Aust Vet J 1987;64(10):323-324.

44. Pacheco LG, Castro TL, Carvalho RD, et al. A role for sigma factor σ(E) in *Corynebacterium pseudotuberculosis* resistance to nitric oxide/peroxide stress. Front Microbiol 2012;3(3):126.

45. Paton MW. Caseous Lymphadenitis, Proceedings of fourth international congress for sheep veterinarians, 121, 1997, Armidale, New South Wales, Australia.

46. Pépin M, Pardon P, Marly J, et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult ewes by inoculation in the external ear. Am J Vet Res 1988;49(4):459-463.

47. O'Reilly KM, Green LE, Malone FE, at al. Parameter estimation and simulations of a mathematical model of *Corynebacterium pseudotuberculosis* transmission in sheep. Prev Vet Med 2008; 83(3-4):242-259.

48. Ellis TM, Sutherland SS, Wilkinson FC, et al. Role of lung *Corynebacterium pseudotuberculosis* lesions in the transmission of this bacterium to other sheep. Aust Vet J 1987;64(9):261-263.

49. Robertson JP. Studies on Diagnosis, Epidemiology and Immunity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection In Sheep. M.phil. Thesis, Murdoch University, Western Australia, 1980:167.

50. Serikawa S, Ito S, Hatta T, et al. Seroepidemiological evidence that shearing wounds are mainly responsible for *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. J Vet Med Sci 1993;55(4):691-692.

51. Paton MW, Walker SB, Rose IR, et al. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. Aust Vet J 2003; 81(1-2):91-95.

52. Zavoshti RF, Khoojine ABS, Helan JA, et al. Frequency of caseous lymphadenitis in sheep slaughtered in an abattoir in Tabriz: comparison of bacterial culture and pathological study. Comp Clin Path 2012;21(5):667-671.

53. Çetinkaya B, Karahan M, Atil E, ve ark. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. Vet Microbiol 2002; 88(1):75-83.

54. Pépin M, Pardon P, Lantier F, et al. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs: kinetics of bacterial dissemination and inflammation. Vet Microbiol 1991;26(4):381-392.

55. Pépin M, Fontaine JJ, Pardon P, et al. Histopathology of the early phase during experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs. Vet Microbiol 1991;29(2):123-134.

56. Pépin M, Paton M, Hodgson ALM. Pathogenesis and epidemiology of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. Curr Top Vet Res 1994;1:63-92.

57. Pépin M, Seow HF, Corner L, et al. Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. Vet Res 1997;28(2):149-163.

58. Stefańska I, Gieryńska M, Rzewuska M, at al. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* within macrophages and induction of phagocytes death. Pol J Vet Sci 2010;13(1):143-149.

59. Bogdan JR, Newlands-Monteith CF, Ellis JA. Nitric oxide production following in vitro stimulation of ovine pulmonary alveolar macrophages. Vet Immunol Immunopathol 1997;56(3-4):299-310.

60. Carne HR. The toxin of *Corynebacterium ovis*. J Pathol and Bacteriol 1940;51(2):199-212.

61. Pépin M, Boisramé A, Marly J. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: biochemical properties, production of toxin and virulence of ovine and caprine strains. Ann Rech Vet 1989;20(1):111-115.

62. Ghadimi M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its pathogenic rules in man and animal. Res Recon 1993;19:78–79.

63. Jolly RD. Some observations on surface lipids of virulent and attenued strains of *Corynebacterium ovis*. J Appl Bacteriol 1966;29(1):186-196.

64. Zaki MM. Relationship between the toxicogenity and pathogenity of *Corynebacterium ovis* in experimentally infected mice. Res Vet Sci 1976;20(2):197-200.

65. Carne HR, Onon EO. Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on endothelial cells of blood vessels. Nature 1978;271(5642):246-248.

66. Nieto NC, Foley JE, MacLachlan NJ, et al. Evaluation of hepatic disease in mice following intradermal inoculation with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Am J Vet Res 2009;70(2):257-262.

67. Ayers JL. Caseous Lymphadenitis in goats and sheep. A review of diagnosis pathogenesis and immunity. J Am Vet Med Assoc 1977;171(12):1251-1254.

68. Renshaw HW, Graff VP, Gates NL. Visceral caseous lymphadenitis in thin ewe syndrome: Isolation of *Corynebacterium*, *Staphylococcus* and *Maroxella spp*. from internal abscesses in emaciated ewes. Am J Vet Res 1979;40(8):1110-1114.

69. Haskell SRR. Caseous Lymphadenitis. In: Haskell SRR (eds.), Blacwell's Five Minute Veterinary Consult: Ruminant, 1st ed. John Wiley and Sons Ltd. Publication, Singapore, 2008: p193-195.

70. Sayın İlhan F. Koyunların kazeöz lenfadenitis enfeksiyonunda patolojik bulgular. YYÜ Vet Fak Derg 2008;19(1):23-28.

71. Maddy KT. Caseous lymphadenitis of sheep. J Am Med Assoc 1953;122(913):257-259.

72. Batey RG, Speed CM, Kobes CJ. Prevalence and distribution of caseous lymphadenitis in feral goats. Aust Vet J 1986;63(2):33-36.

73. Gezon HM, Bither HD, Hanson LA, et al. Epizootic of external and internal abscesses in a large goat herd over a 16-year period. J Am Vet Med Assoc 1991;198(2):257-263

74. Zaitoun AM, Bayoumi AH. Some epidemiological studies on ovine pseudotuberculosis. Assiut Vet Med J 1994;31(61):238-250.

75. Stoops SG, Renshaw HW, Thilsted JP. Ovine caseous lymphadenitis. Disease prevalence, lesion distribution and thoracic manifestations in a population of mature culled from Western United States. Am J Vet Res 1984;45(3):557-561.

76. Unanian MM, Feliciano Silva AED, Pant KP. Abscesses and caseous lymphadenitis in goats in tropical semi-arid north-east Brazil. Trop Anim Hlt Prod 1985;17(1):57–62.

77. Walker J, Jackson H, Brandon MR, et al. Lymphocyte subpopulations in pyogranulomas of caseous lymphadenitis. Clin Exp Immunol 1991;86(1):13-18.

78. Ellis JA. Immunophenotype of pulmonary infiltrates in sheep with caseous lymphadenitis. Vet Pathol 1988;25(5):362-368.

79. Erganiş O, Kaya O, Ateş M, ve ark. Konya EB Kombinasında kesilen koyunlardaki apseli lenf yumuruları üzerine mikrobiyolojik ve serolojik incelemeler. Veterinarium 1990;1:8-11.

80. Muz A, Eröksüz H, Öngör H, ve ark. Elazığ Et ve Balık Kurumu Mezbahasında kesilen koyunlardaki apseli preskapular lenf yumruları üzerinde mikrobiyolojik, serolojik ve histopatolojik incelemeler. FÜ Sağ Bil Derg 1995;9:204-211.

81. Eckersall PD, Lawson FP, Bence L, et al. Acute phase protein response in an experimental model of ovine caseous lymphadenitis. BMC Vet Res. 2007;3:35.

82. Uysal A, Or E. Sağlıklı ve pseudotüberkülozlu kuzuların bazı serum değerleri üzerine karşılaştırmalı çalışmalar. İÜ Vet Fak Derg 1993;19(1):27-31.

83. Kumar J, Tripathi BN, Kumar R, et al. Rapid detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in clinical samples from sheep. Trop Anim Health Prod 2013; 45(6):1429-1435.

84. Smith BP. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in animals. In: Large Animal Internal Medicine. St Louis, Baltimore, Philadelphia, Toronto, The C.V. Mosby Company, 1990:p1120-1126.

85. Dercksen DP, Brinkhof JMA, Dekker-Nooren T, et al. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. Vet Microbiol 2000;75(2):167–175

86. Shigidi MTA. A comparison of five serological tests for the diagnosis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in sheep. Br Vet J 1979;135(2):172-177.

87. Middleton MJ, Epstein VM, Gregory GG. Caseous lymphadenitis on Flinders Island: prevalence and management surveys. Aust Vet J 1991;68(9):311-312.

88. Menzies PI, Hwang TI, Prescott JF. Comparison of an interferon-gamma to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats. Vet Microbiol. 2004;100(1-2):129-137.

89. Stanford K, Brogden KA, McClelland LA, et al. The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. Can J Vet Res 1998;62(1):38-43.

90. Çetinkaya B, Karahan M, Atil E, ve ark. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. Vet Microbiol 2002; 88(1):75-83.

91. Zaki MM. The application of a new technique for diagnosing *Corynebacterium ovis* infection, Res Vet Sci 1968;9(6):489-493.

92. Shigidi MTA. An indirect haemaglutinin test for the serodiagnosis of *C.ovis* infection in sheep. Res Vet Sci 1978;24(1):57-60.

93. Burrell DH. A hemolysis inhibition test for detection of antibody to *Corynebacterium ovis* exotoxin. Res Vet Sci 1980;28(2):190-194.

94. Burrell DH. A simplified double immunodiffsusion test for detection of *Corynebacterium ovis* antitoxin. Res Vet Sci 1980;28(2):234-237.

95. İlhan Z. Koyunlarda *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in ELISA ve Dot-Blot ELISA ile teşhisi. Turk J Vet Anim Sci 2003;27:1327-1333.

96. Paule BJA, Azevedo V, Regis LF, et al. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon-γ production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. Vet Immunol Immunopathol 2003;96(3-4):129–139.

97. Sunil V, Menzies PI, Shewen PE, et al. Performance of a whole blood interferon-gamma assay for detection and eradication of caseous lymphadenitis in sheep. Vet Microbiol 2008;128(3-4):288–297.

98. Prescott JF, Menzies PI, Hwang YT. An interferon-gamma assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult sheep from a research flock. Vet Microbiol 2002;88(3):287-297.

99. Farid A, Mahmoud AH. Primary trials on the diagnosis of Caseous lymphadenitis in Egypt by means of intradermal inoculation of allergic material. Vet Med J 1960;7(7):253-258.

100. Koyuncuoğlu Y. Koyun pseudotüberküloz'unun allerjik deri testi ile teşhisi üzerinde çalışmalar. Turk J Vet Anim Sci 2003;27:1035-1041.

101. Carne HR. The diagnosis of caseous lymphadenitis by means of intradermal inoculation of allergic reagents. Aust Vet J 1932;8(2):42-47.

102. Alves FSF, Olander HJ. Skin test of goats vaccinated and infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis.* 1999;34(7):1313-1318.

103. Richard Y, Fontaine M, Oudar J, et al. Contribution à l'étude de l'épidémiologie et de la pathogénie de la maladie des abcès du mouton. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 1979;2(1):125-148

104. Washburn KE, Bissett WT, Fajt VR, et al. Comparison of three treatment regimens for sheep and goats with caseous lymphadenitis J Am Vet Med Assoc 2009;234(9):1162-1166.

105. Brogden KA, Chedid L, Cutlip RC, et al. Effect of muramyl dipeptide on immunogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* whole-cell vaccines in mice and lambs. Am J Vet Res 1990;51(2):200-202.

106. Ellis JA, Hawk DA, Holler LD, et al. Differential antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep with naturally acquired caseous lymphadenitis. J Am Vet Med Assoc 1990;196(10):1609-1613.

107. Irwin MR, Knight HD. Enhanced resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections associated with reduced serum immunoglobulin levels in levamisole-treated mice. Infect Immun 1975;12(5):1098-1103.

108. Lan DT, Taniguchi S, Makino S, et al. Role of endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. Microbiol Immunol 1998;42(12):863-870.

109. Lan DT, Makino S, Shirahata T, et al. Tumor necrosis factor alpha and gamma interferon are required for the development of protective immunity to secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. J Vet Med Sci 1999;61(11):1203-1208.

110. Eggleton DG, Doidge CV, Middleton HD, et al. Immunization against ovine caseous lymphadenitis: efficacy of monocomponent *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid vaccine and combined clostridial-corynebacterial vaccines. Aust Vet J 1991;68(10):320-321.

111. Brogden KA, Cutlip RC, Lehmkuhl HD. Comparison of protection induced in lambs by *Corynebacterium pseudotuberculosis* whole cell and cell wall vaccines. Am J Vet Res 1984;45(11):2393-2395.

112. Piontkowski MD, Shivvers DW. Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. J Am Vet Med Assoc 1998;212(11):1765-1768.

113. Cameron CM. Effect of levamisole on immunity to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in mice and sheep. Onderstepoort J Vet Res 1977;44(1):47-48.

114. Brown CC, Olander HJ, Biberstein EL, et al. Use of a toxoid vaccine to protect goats against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Am J Vet Res 1986;47(5):1116-1119.

115. Eggleton DG, Haynes JA, Middleton HD, et al. Immunization against ovine caseous lymphadenitis: correlation between *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid content and protective efficacy in combined clostridial-corynebacterial vaccines. Aust Vet J 1991;68(10):322-325.

116. İzgür M, Akan M, İlhan Z, ve ark. Studies on vaccine development for ovine caseous lymphadenitis. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2010;57:161-165.

117. Paton MW, Sutherland SS, Rose IR, et al. The spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection to unvaccinated and vaccinated sheep. Aust Vet J. 1995;72(7):266-269.

118. Eggleton DG, Middleton HD, Doidge CV, et al. Immunization against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. Aust Vet J 1991;68(10):317-319.

119. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. YYÜ Vet Fak Derg 2004;15:91-96.

120. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem 1995;41(12):1819-1828.

121. Yarsan E. Lipid peroksidasyon olayı ve önlenmesine yönelik uygulamalar. YYÜ Vet Fak Derg 1998;9:89-95.

122. Kunwar A, Priyadarsini KI. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. J Med Allied Sci 2011;1(2):53-60.

123. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. Nutr 2002; 18(10):872-879.

124. Schreck R, Baeuerle PA. A role for oxygen radicals as second messengers. Trends Cell Biol 1991;1(2-3):39–42.

125. Tamer L, Polat G, Eskandari G, ve ark. Serbest radikaller. Mersin Üniv Tıp Fak Derg 2000;1:52-58.

126. Favier A, Sappey C, Leclerc P, et al. Antioxidant status and lipid peroxidation in patients infected with HIV. Chem Biol Interact 1994;91(2-3):165-180.

127. Paradis V, Mathurin P, Kollinger M, et al. In situ detection of lipid peroxidation in chronic hepatitis C: correlation with pathological features. J Clin Pathol 1999;50:401-406.

128. Çam Y, Atalay Ö, Atasever A. Plasma malondialdehyde level and erythrocyte catalase activity in lambs and ewes infected with sheep pox. Indian Vet J 2009; 86(5):525-526.

129. Aydilek N, Aksakal M. Testosteronun tavşanlarda karaciğer antioksidan sistemi üzerine etkisi. YYU Vet Fak Derg 154;14:22-25.

130. Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. Nature Chem Biol 2008;4:278-286.

131. Sevanian A, Ursini F. Lipid peroxidation in membranes and low-density lipoproteins: similarities and differences. Free Radic Biol Med 2000;29(3-4):306-311.

132. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. Am J Clin Nutr 1993;57(5):715-725.

133. Richter C. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes: Chemistry and physics of lipids. Chem Phys Lipids 1987;44:175-189.

134. De Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, et al. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. Free Radic Biol Med 1999;27:202-226.

135. Beckman KB, Ames BN. Oxidative decay of DNA. J Biol Chem 1997;272(32):19633–19636.

136. Cordis GA, Das DK, Riedel W. High-performance liquid chromatographic peak identification of 2, 4-dinitrophenylhydrazine derivatives of lipid peroxidation aldehydes by photodiode array detection. J Chromatogr A 1998;798(1-2):117-123.

137. Anoopkumar-Dukie S, Walker RB, Daya S. A sensitive and reliable method for the detection of lipid peroxidation in biological tissues. J Pharm Pharmacol 2001;53(2):263-266.

138. Templar J, Kon SP, Milligan TP, et al. Increased plasma malondialdehyde levels in glomerular disease as determined by a fully validated HPLC method. Neprol Dial Transplant 1999;14(4):946-951.

139. Madebo T, Lindtjorn B, Aukrust P, et al. Circulating antioxidants and lipid peroxidation products in untreated tuberculosis patients in Ethiopia. Am J Clin Nutr 154;78(1):117–122.

140. Safarian MD, Karagezian KG, Karapetian ET, et al. The efficacy of antioxidant therapy in patients with tuberculosis of the lungs and the correction of lipid peroxidation processes. Prob Tuberk 1990;5:40-44

141. Kandemir O, Eskandari G, Camdeviren H, ve ark. Plasma malondialdehyde and nitrate levels in patients with brucellosis. MEU Tıp Fak Derg 2002;3:405–409.

142. Demir S, Yılmaz M, Köseoğlu M, ve ark. Role of free radicals in peptic ulcer and gastritis. Turk J Gastroenterol 154;14:39-43.

143. Özçelik M, İssi M, Gül Y ve ark. Bakteriyel Pnömonili Besi Sığırlarında Oluşan Serbest Radikal Hasarının Antioksidan Aktivite ve Bazı Mineral Maddeler Üzerine Etkisi. ERÜ Vet Fak Derg 2014;11(2)111-116

144. Kızıl Ö, Gül Y. Şap aşısı uygulanan besi sığırlarında antioksidan vitaminlerin klinik ve bazı hematolojik parametreler ile antioksidan enzim ve lipid peroksidasyon düzeylerine etkileri. FÜ Sağlık Bil Dergisi 2004;18(2):97-106

145. Jovanović IB, Veličković M, Vuković D, et al. Effects of different amounts of supplemental selenium and vitamin E on the incidence of retained placenta, selenium, malondialdehyde, and thyronines status in cows treated with prostaglandin $F_{2\alpha}$ for the induction of parturition. J Vet Med 2013;2013:6

146. Avcı C, Kızıl Ö. Geçiş dönemindeki ineklerde stres parametreleri üzerine mineral uygulamasının etkileri. FÜ Sağ Bil Vet Derg 2012;26(2):087-091.

147. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicol Pathol. 2002;30(6):620-50.

148. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed. Oxford University Pres, New York, 1999:p246-351.

149. De la Fuente M. Effects of antioxidants on immune system and ageing. Eur J Clin Nutr 2002;56(3):5-8.

150. De la Fuente M. Victor VM. Antioxidants as modulators of immune function. Immunol Cell Biol 2000;78:49-54.

151. Victor VM, De la Fuente M. N-acetylcysteine improves in vitro the function of macrophages from mice with endotoxin induced oxidative stress. Free Rad Res 2002;(36):33-45

152. Knight JA. Review: free radicals, antioxidants and immune system. Ann Clin Lab Sci 2000;30:145-158

153. Heaton PR, Reed CF, Mann SJ, et al. Role of dietary antioxidants to protect against DNA damage in adult dogs. J Nutr 2002;132(6):1720-1724.

154. Marikovsky M, Ziv V, Nevo N, et al. Cu/Zn superoxidedismutase playsimportant role in immune response. J Immunol 2003;170(6):2993-3001.

155. Break TJ, Jun S, Indramohan M, et al. Extracellular superoxide dismutase inhibits innate immune responses and clearance of intracellular bacterial infection. J Immunol 2012;188:3342-3350

156. Vouldoukis I, Sivan V, Vozenin MC, et al. Fc-receptor-mediated intracellular delivery of Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1) protects against redox-induced apoptosis through a nitric ox-ide dependent mechanism. Mol Med 2000;6(12)1042

157. Stỳblo M, Walton FS,Harmon AW, et al. Activation of superoxidedismutase in selenium-deficient mice infected with influenza virus. J Trace Elem Med Biol 2007;21(1):52-62.

158. Michiels C, Raes M, Toussaint O, et al. Importance of Se-Glutathione Peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD cell survival against oxidative stress. Free RadicBiol Med 1991;17:235-248.

159. Kelly FJ. Use of antioxidants in the prevention and treatment of disease. JFCC 1988;10:21-23.

160. Imai HI, Nakagawa Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. Free Radic Biol Med 2003;34(2):145-169.

161. Nemec M, Hidiroglou M, Nielsen K, Proulx J. Effect of vitamin E and selenium supplementation on some immune parameters following vaccination against brucellosis in cattle. J Anim Sci 1990;68(12):4303-4309.

162. Dhur A, Galan P, Hercberg S. Relationship between selenium, immunity and resistance against infection. Comp Biochem Physiol C 1990;96(2):271-280.

163. Finch JM, Turner RJ. Selenium supplementation in lambs: effects on antibodyresponsesto a salmonella vaccine. Vet Rec 1986;119(17):430-431.

164. Leyan V, Pesuticd D, Schuring G, et al. Dementación con selenio en vaquillas: Efectosobre la respuestainmune a lasvacunas Brucellaabortus cepa RB51 y toxoidetetánico. Arch Med Vet 2005;37(2):105-110.

165. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol 1997;15:323-350.

166. Genuardi JA, Eskew ML, Zeligs BJ, et al. The effects of vitamin E and Selenium on the Nitric Oxide production of macrophages. Pediatric Res 1999;45:771–771

167. Visser AE, Abraham A, Sakyi LJ, et al. Nitric Oxide inhibits establishment of macro schizont infected- cell lines and is produced by macrophages of calves undergoing bovine Tropical Theileriosis or East Coast Fever. Parasite Immunol 1995;17:91-102.

168. Richardson JO, Forsyth LMG, Brown CGD, et al. Nitric oxide causes the macroschizonts of *Theileria annulata* to disappear and host cells to become apoptotic. Vet Res Commun 1998;22(1):31-45.

169. Haque SS. Impact of nitric oxide precursor L-arginine on oxidative stress against typhoid. BratislLekListy. 2012;113(10):589-591.

170. Ralph AP, Yeo TW, Salome CM, et al. Impaired pulmonary nitric oxide bioavailability in pulmonary tuberculosis: association with disease severity and delayed mycobacterial clearance with treatment. J Infect Dis 2013;208(4):616-626.

171. Grasemann H, Ioannidis I, de Groot H, et al. Metabolites of nitric oxide in the lower respiratory tract of children. Eur J Pediatr 1997;156(7):575-578.

172. Bukan N, Sancak B, Kalkancı A, ve ark. Kandidozlu farelerde hepatic malondialdehit, nitrikoksit düzeyleri ve süperoksitdismutaz, glutatyon peroksidaz enzim aktivitelerine dair ön çalışma. T Klin Tıp Bilimleri 154;23(4):285-288.

173. Granger DL, Hibbs JB Jr, Perfect JR, et al. Specific amino acid (L-arginine) requirement for the microbiostatic activity of murine macrophages. J Clin Invest 1988;81(4):1129-1136.

174. Feng HM, Popov VL, Walker DH. Depletion of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in mice with Rickettsia conorii-infected endothelium: impairment of rickettsicidal nitric oxide production resulting in fatal, overwhelming rickettsial disease. Infect Immun 1994;62(5):1952-1960.

175. Schroppel K, Kryk M, Herrmann M, et al. Suppression of type 2 NO-synthase activity in macrophages by Candida Albicans. Int J Med Microbiol 2001;290(8):659-668.

176. Nisbet C, Yarım GF, Çiftçi A, ve ark. Investigation of serum nitric oxide and malondialdehyde levels in cattle infected with Brucella abortus. Ankara Üniv Vet FakDerg 2007;54:159-163.

177. Prabhu KS, Zamamiri-Davis F, Steward JB, et al. Selenium deficiency increases the expression of inducible nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophages: role of nuclear factor-kappaB in up-regulation. Biochem J 2002;366(1):203–209.

178. Noaman E, Zahran AM, Kamal AM, et al. Vitamin E and selenium administration as a modulator of antioxidant defense system: biochemical assessment and modification. Biol Trace Elem Res 2002;86(1):55-64.

179. Randjelovic P, Veljkovic S, Stojiljkovic N, et al. Protective effect of selenium on gentamicin-induced oxidative stress and ephrotoxicity in rats. Drug Chem Toxicol 2012;35(2):141-148.

180. Sun E, Xu H, Liu Q, et al. The mechanism or the effect of selenium supplementation on immunity. Biol Trace Elem Res 1995;48(3):231-238.

181. Sun E, Xu H, Liu Q, et al. Effect of selenium in recovery of immunity damaged by H_2O_2 and 60Co radiation. Biol Trace Elem Res 1995;48(3):239-250.

182. Kiremidjian-Schumacher L, Roy M, Wishe HI, et al. Selenium and immune cell functions. I. Effect on lymphocyte proliferation and production of interleukin 1 and interleukin 2. Proc Soc Exp Biol Med 1990;193(2):136-142.

183. Kiremidjian-Schumacher L, Roy M. Selenium and immune function. Z Ernahrungswiss 1998;37(1):50-56.

184. Kiremidjian-Schumacher L, Roy M, Wishe HI, et al. Regulation of cellular immune responses by selenium. Biol Trace Elem Res 1992;33:23-35.

185. Paolicchi F, Perea J, Cseh S, et al. Relationship between Paratuberculosis and the microelements Copper, Zinc, Iron, Selenium and Molybdenum in Beef Cattle. Braz J Microbiol 2013;44(1):153-160.

186. Larsen HJ, Moksnes K, Overnes G. Influence of selenium on antibody production in sheep. Oslo Res Vet Sci 1988;45(1):4-10.

187. Khoo C, Cunnick J, Friesen K, et al. The role of supplementary dietary antioxidants on immune response in puppies. Vet Ther 2005;6(1):43-56.

188. Reffett JK, Spears JW, Brown TT, et al. Effect of dietary selenium and vitamin E on the primary and secondary immune response in lambs challenged with parainfluenza3 virus. J Anim Sci 1988;66(6):1520-1528.

189. Spallholz JE, Martin JL, Gerlach ML, et al Enhanced immunoglobulin M and immunoglobulin G antibody titers in mice fed selenium. Infect Immun 1973;8(5):841-842.

190. Spallholz JR, Martin JL, Gerlach ML, et al. Injectable Selenium: Effect on the Primary Immune Response of Mice (38472). Proc Soc Exp Biol Med 1975;148(1):37-40.

191. Hill CH. Dietetary influences on resistance to Salmonella infections in chicks. Fed Proc 1979;38(7):2129-2133.

192. Sheffy BE, Schultz RD. Influence of vitamin E and selenium on immune response mechanisms. Fed Proc 1979;38(7):2139-2143.

193. Bauersachs S, Kirchgessner M, Paulicks BR. Effects of different levels of dietary selenium and vitamin E on the humoral immunity of rats. J Trace Elem Electrolytes Health Dis 1993;7(3):147-152.

194. Bendich A. Vitamin E and immune functions. Basic Life Sci 1988;49:615-620.

195. Beharka A, Redican S, Leka L, et al. Vitamin E status and immune function. Methods Enzymol 1997;282:247-263.

196. Moriguchi S, Muraga M. Vitamin E ve bağışıklık. Vitam Horm 2000;59:305-36.

197. Barber TL, Nockels CF, Jochim MM. Vitamin E enhancement of Venezuelan equine encephalomyelitis antibody response in guinea pigs. Am J Vet Res 1977;38(6):731-734.

198. Friedman A, Bartov I, Sklan D. Humoral immune response impairment following excess vitamin E nutrition in the chick and turkey. Poult Sci 1998;77(7):956-62.

199. Nockels CF. Protective effects of supplemental vitamin E against infection. Fed Proc 1979;38(7):2134-2138.

200. Reffett JK, Spears JW, Brown TT Jr. Effects of dietary selenium on the primary and secondary immune response in calves challenged with infectious bovine rhinotracheitis virus. J Nutr 1988;118(2):229-235.

201. Smith KL, Conrad HR, Amiet BA, et al. Effect of vitamin E and selenium dietary supplementation on mastitis in first lactation cows. J Dairy Sci 1985;86(1):190.

202. Finch JM, Turner RJ. Selenium supplementation in lambs: effects on antibody responses to a Salmonella vaccine. Vet Rec 1986;119(17):430-431.

203. Fairbanks VF, Klee GG. Biochemical aspect of hematology. In: Tiez NW (ed): Fundamentals of Clinical Chemistry, 3 th ed. WB Saunders, Philadelphia. 1987:p803-804.

204. Yoshioka T, Kawada K, Shimada T. Lipid peroxidation in material and cord blood and protective mechanism against activated-oxygentoxicity in the blood. Am J Obstet Gynecol 1979;135(3):372-376.

205. Sun J. Assessment on acute toxicity of combined pesticides. Wei Sheng Jiu 2000; 29(2):65-68.

206. Luck H. Catalase. In: Bergmeyer HU (ed), Methods of Enzymatic Analysis, New York, Verlay Chemical and Academic Press, 1963:p885-888.

207. Paglie DE, Valentie WN. Studies on the qualitative and quantitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Med 1967;70(1): 158-169.

208. Tracey WR, Tse J, Carter G. Lipopolysaccharide-induced changes in plasma nitrite and nitrate concentrations in rats and mice: pharmacological evaluation of nitric oxide synthase inhibitors. J Pharmacol Exp Ther 1995;272(3):1011-1015.

209. Subbaiah KC, Raniprameela D, Visweswari G, et al. Perturbations in the antioxidant metabolism during Newcastle disease virus (NDV) infection in chicken: protective role of vitamin E. Naturwissenschaften 2011;98(12):1019-1026.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
KAYSERİ-TÜRKİYE

ETİK KURULUN ADI : Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı
ETİK KURULUN ADRESİ : Erciyes Üniversitesi

Tarih: 13.04.2011 **Toplantı Sayısı:** 4 **Karar No:** 11/45

Etik kurul toplantısı **13.04.2011** tarihinde Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul **Prof.Dr.Zübeyde GÜNDÜZ** Başkanlığı'nda gerçekleştirilmiştir.

Üye Adı/Soyadı	Akademik Ünvanı	Fakültesi	
Zübeyde Gündüz	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
..run Ülger	Prof. Dr	Tıp Fakültesi	
Özlem Canöz	Prof.Dr.	Tıp Fakültesi	
Hatice Özbilge	Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Servet Kesim	Yrd. Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Davut Bayram	Öğrt.Gör.Dr.	Veteriner Fakültesi	
Coşkun Tez	Doç. Dr.	Fen Fakültesi	
M. Betül Aycan	Yrd. Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi(Farmakoloji)	
Ahmet Öztürk	Öğrt.Gör.Dr		
Serap Altuntaş Eroğlu	Avukat		Katılmadı
..il Tekiner	Eczacı		Katılmadı

Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Yrd.Doç.Dr. Öznur ARSLAN tarafından yapılan " Kazeöz Lenfadenitise Karşı Aşılanan Kuzularda E Vitamini ve Selenyum Uygulamalarının Oksidatif Stres ve Bağışıklık Üzerine Etkisi"adlı araştırması incelenerek çalışmasının yapılmasının uygun olacağına ve rektörlük makamına sunulmasına oy birliğiyle karar verildi.

ASLININ AYNIDIR

Tarih : 13.04.2011

Etik Kurul Başkanı İmzası

Etik Kurul Başkanı : Prof.Dr.Zübeyde GÜNDÜZ

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Kayacan SEYRANOĞLU

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 27 Kasım 1976, Ardahan

Medeni Durumu: Evli

Tel: +90 507 260 38 33

Fax: +90 352 512 19 91

email: drkycn@gmail.com

Yazışma Adresi: İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü

Pınarbaşı/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüskek Lisans	Fırat Üniv. Veteriner Fak.	2000
Lise	Sırrı Yırcalı Anadolu Lisesi, Balıkesir	1995

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2006- Halen	Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Pınarbaşı İlçe Müd.	Veteriner Hekim

YABANCI DİL

İngilizce