

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BABESİOSİSLİ KOYUNLARDA HEMOGLOBİN TİPLERİ VE
GLUTATYON DÜZEYLERİ**

Sağlık Memuru Ümit ŞANLI
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Yeter DEĞER

VAN- 2008

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BABESİOSİSLİ KOYUNLARDA HEMOGLOBİN TİPLERİ VE
GLUTATYON DÜZEYLERİ**

Sağlık Memuru Ümit ŞANLI
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Serdar DEĞER

Üye
Prof. Dr. Fatmagül YUR

Üye
Doç. Dr. Yeter DEĞER

TEZ KABUL TARİHİ
/ /2008

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında hiçbir desteğini esirgemeyen Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Yeter DEĞER'e, Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Nihat MERT başta olmak üzere, Sayın Prof. Dr. Fatmagül YUR'a, istatistik analizlerde yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Semiha Dede'ye, diğer öğretim üyelerine ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma, paraziter muayenedeki değerli yardımlarından dolayı Prof. Dr. Serdar DEĞER ve Yrd. Doç. Nalan ÖZDAL'a, elektroforetik analizlerdeki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Ramazan ŞEKEROĞLU'na ve laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Laborant Sayın Taner KÖMÜROĞLU'na ve beni yetiştiren, desteklerini esirgemeyen aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
Teşekkür	III
İçindekiler	IV
Simgeler ve Kısaltmalar	VI
Şekiller	VII
Çizelgeler.....	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Babesiosis	3
2.1.1. Tarihçe	4
2.1.2. Etiyoloji	4
2.1.3. Epidemiyoloji	5
2.1.4. Patogenez	5
2.1.5. Semptomlar	6
2.1.6. Nekropsi	7
2.1.7. Tanı.....	8
2.1.8. Korunma	8
2.2. Glutasyon	8
2.2.1. Glutasyonun kimyasal özellikleri.....	9
2.2.2. Glutasyonun biyosentezi.....	10
2.2.3. Glutasyonun biyolojik fonksiyonları	10
2.3. Hemoglobin.....	11
2.3.1. Hemoglobin tiplerinin tespitinde kullanılan elektroforetik yöntemler	13
2.3.2. Koyunlarda hemoglobin tipleri.....	14
2.3.3. Hemoglobin tiplerinin adaptasyon ve hastalıklara mukavemet üzerine etkisi, fizyolojik farklılıkları	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Gereç.....	18

3.1.1. Hayvan materyali	18
3.1.2. Kullanılan alet ve malzemeler	18
3.1.3. Kimyasal maddeler.....	19
3.2. Yöntem	19
3.2.1. Paraziter ve klinik muayene.....	19
3.2.2. Kan örneklerinin alınması ve hazırlanması.....	20
3.2.3. Kan glutatyon analiz metodu	20
3.2.4. Hemoglobin tip tayin metodu.....	21
3.2.5. Sellüloz asetat elektroforezi ile Hb tiplerinin tayini.....	22
3.3. İstatistik Analiz.....	24
4. BULGULAR	25
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	29
ÖZET	33
SUMMARY	34
KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ	42

SİMGELER VE KISALTMALAR

µg	: Mikrogram
µmol	: Mikromol
°C	: Santigrat derece
ADP	: Adenozin difosfat
ATP	: Adenozin tripfosfat
dk	: Dakika
dl	: Desilitre
DNA	: Deoksi ribonükleik asit
DPG	: Difosfogliserat
DTNB	: 5,5'-2 ditiobis nitrobenzoik asit
EDTA	: Disodyum etilen diamin tetraasetik asit
ELİSA	: Enzyme Linked Immun Assay
FAD	: Flavın adenin dinükleotit
gr	: Gram
GSH	: Redükte glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GSSG	: Okside glutatyon
GSSGR	: Glutatyon reduktaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
mEq	: Miliekivalent
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mmol	: Milimol
Na ₂ HPO ₄	: glasiyel metafosforik asit
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimer Zincir Reaksiyou)
PCV	: Hematokrit değeri
PCV	: Packet Cell Volume
pH	: Hidrojen iyon konsantrasyonu
ppm	: Part per million
ROOH	: Hidroperoksit
-SH	: Sülfidril grubu
V	: Volt

ŞEKİLLER

Şekil 1. <i>Babesia</i> 'nın biyolojisi.....	6
Şekil 2. Glutasyonun yapısı.....	9
Şekil 3. Hemoglobin tiplerinin elektroforetik göç hızları.....	23
Şekil 4. Babesiosis'li Akkaraman koyunların hemoglobin genotiplerinin elektroforegramı	27
Şekil 5. Sağlıklı Akkaraman koyunların hemoglobin genotiplerinin elektroforegramı.....	28

ÇİZELGELER

Çizelge 1. Babesiosisli ve sağlıklı Akkaraman koyunlarının glutatyon değerleri	25
Çizelge 3. Babesiosisli ve sağlıklı Akkaraman koyunlarının hemoglobin genotipleri	26

1. GİRİŞ

Kenelerin aktif olduğu yaz aylarında babesiosis vakalarına ülkemizde sıklıkla rastlanmaktadır. Yüksek ateş, ikterus, anemi, hemoglobinüri gibi klinik belirtilerin yanında, kanın şekilli elemanları, özellikle eritrosit miktarlarında azalma olur. Bir protozoon hastalığı olan babesiosis, tropik, subtropik ve hatta ılıman bölgelerde yaygındır. Ülkemizde sığır, koyun ve keçilerde görülür ve büyük ekonomik kayıplara neden olur. Paraziter hastalıklar, hayvanları iz element ve vitamin eksikliklerine karşı duyarlı hale getirmelerinin yanı sıra anemi şekillenmesine de neden olurlar. Babesia gibi kan parazitleri konakçı hayvanın kanında eritrositlerin içinde yaşar ve yerleştikleri eritrositi sindirirler (Kettle, 1995; Radostits ve ark., 1995; Değer ve ark., 2001).

Yapısal ve katalitik olarak pek çok önemli görevleri olan proteinler, kanda farklı çöktürme teknikleri ile saptanırlar. Elektroforetik tekniklerin gelişmesiyle 20'den fazla protein ayırt edilmiştir. Böylelikle proteinlerin yapıları, hastalıklarla ilişkileri açıklanmıştır. Elektroforez, yüklü partiküllerin bir elektrik akımının tesiri ile birbirlerinden ayrılması olayıdır. Bir iyonun göç hızı, tatbik edilen elektrik akımına, iyonun büyüklüğüne, şekline ve elektrik yüküne bağlıdır (Mert ve ark., 1997; Mehmetoğlu, 2002).

Kan proteinlerinin en önemlilerinden olan hemoglobinin yapısı hem+ globinden oluşur. Demir içeren protoporfirin 9'a hem adı verilir. Dört adet hem, bir globin molekülü ile bağlanarak hemoglobini meydana getirir (Williams ve ark., 1983; Kretschmar ve Klinger, 1990; Başpınar ve ark., 1987).

Glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşan bir tripeptit olan glutatyon (GSH) hemen hemen bütün hücrelerde, oldukça yüksek konsantrasyonlarda bulunur. GSH, protein ve DNA sentezi, hidroperoksit transportu, proteinlerin sülfhidril gruplarının devamının sağlanması, hücreleri ve eritrositleri radyasyon ve serbest radikallerin yıkıcı etkilerine karşı korunması, enzim aktivitesinin modülasyonu, ksenobiotiklerin detoksifikasyonu gibi pek çok önemli biyolojik olayda rol alır (Meister, 1984; Lee ve ark., 1993).

Ülkemizde yaygın olarak bulunan kan parazitleri, hayvan ekonomisi açısından önemli kayıplara yol açmaktadır. Bu çalışmada, babesiosisli koyunlarda Hb tipleri ve glutatyon düzeylerinin belirlenmesi ve bu parametrelerin hastalığın ortaya çıkışı üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

Ülkemizde çok yaygın olan paraziter hastalıklar ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Türkiye ekonomisine büyük darbeler vuran bu hastalıklardan korunmak için tanı ve özellikle erken teşhis oldukça önemlidir. Yıllardır yoğun olarak devam eden hayvan hareketleri ve hüküm süren farklı iklim koşulları nedeniyle parazitlerin gelişimi için uygun bir ortam olan Türkiye’de, evcil hayvanlarda endoparazitlere bağlı olarak meydana gelen paraziter invazyonlara çok sık rastlanılmaktadır (Güralp ve Simms, 1960; Güralp ve Simms, 1964).

Sahip olduğu yüksek koyun popülasyonu ile dünya ülkeleri arasında üst sıralarda yer alan ülkemiz için koyun yetiştiriciliği büyük ekonomik önem taşır. Paraziter invazyonlar koyun yetiştiriciliğinde et, süt, deri ve yapağı verimini düşürmekte, dolayısıyla ülke ekonomisi büyük zarar görmektedir (Değer, 1996).

Günümüzde paraziter hastalıkların erken teşhisinde rutin parazitolojik muayenelerin yanında, konakçının biyokimyasal yapısında meydana gelen bazı değişikliklerin tespiti ve serolojik testlerden yararlanılmaktadır.

2.1. Babesiosis

Babesiosis kan emen kenelerle bulaştırılan ve *Babesia* türü protozoalar tarafından meydana getirilen bir protozoon hastalığıdır. *Babesia* soyu *Piroplasmida* dizisinin *Babesidae* ailesi içerisinde yer alan hücre içi parazitlerdir. Bütün *Piroplasmida* dizisindeki etkenlerin yaptıkları enfeksiyonlara piroplasmosis adı verilir. Sığırlarda yaşayan *Piroplasma*’ları ilk defa Babés’in keşfetmesinden dolayı, sebep oldukları enfeksiyonlara babesiosis adı verilir (Bilal, 2005; Mimioğlu ve Göksu, 1969).

Koyun ve keçilerin *Babesidae* enfeksiyonları dünyanın çeşitli bölgelerinde “carceag”, ictero-hematuria, “jaunise”, “koyunların malaryal kataral humması” ve “haemoglobinuria” gibi adlar alır. Türkiye’de halk arasında koyun ve keçilerin piroplasmosis ve babesiosis’ine “ağrı”, “ağrık”, “ağırma”, “sıtma”, “kırça” denmektedir (Mimioğlu ve Göksu, 1969).

2.1.1. Tarihçe

Piropasmida'lar ilk defa 1888 yılında Romanya sığırlarında Babés tarafından keşfedildi. 1892'de yine Babés, koyunlarda enzootik hemoglobinüriye sebep olan etkenlerin kenelerle nakledildiklerini buldu. Türkiye'de 1890'da Nicole ve Adil, sığır piropasmaları üzerinde etütler yaptı. 1899'da Guglielmi, İtalya'da atlardaki *Piropasmaları* keşfetti. 1900'de Ligniérés Arjantin'de aynı etkenleri buldu. Koch 1904'de, alyuvarlarda basil şeklinde parazitler gördü ve *Piropasma bigeminum*'un genç şekilleri olarak kabul etti. Gonder, Nuttall, Graham, Sergeant ve arkadaşları, Yakimoff ve arkadaşları bu etkenlerin sistem, biyoloji, bağışıklık ve tedavileri üzerinde çalışmalar yaptı. Sözü edilen bu etkenler *Babesidae*, *Theileridae* ve *Anaplasmodae* ailelerinde toplandı (Curasson, 1943).

Babesia etkenleri koyun ve keçilerin alyuvarlarında bulunur. *Piropasma ovis*'i Lestoquard, Cezayir'de; Dschunkowsky ve Luhs Kafkasya'da; Inchiostri, Dalmaçya'da tespit ettiler. Enigk (1956), Almanya'da koyunlarda *Babesia motasi* ve *Theileria recondita*'yı tespit etti. *P. ovis* Güney Avrupa, Akdeniz ülkeleri, Afrika, Rusya, Asya ve diğer tropik ve subtropik bölgelerde rastlanmaktadır. Yurdumuzda Tüzdil (1936), Özcan (1961) ve Göksu (1967) tarafından yapılan araştırmalara göre babesiosis yerli koyun ve keçilerde daha sık görüldü.

2.1.2. Etiyoloji

Babesiosis koyun ve keçilerde *B. ovis* ve *B. motasi* tarafından meydana getirilen, akut, subakut veya latent seyreden, mevsime bağlı protozoer bir hastalıktır. *Babesiaların* vektörleri 1, 2, 3 konakçılı kenelerdir. Bunlar *Boophylus spp.*, *Hyalomma spp.*, *Rhipicephalus spp.*, *Haemophysalis spp.*, *Dermacentor spp.* ve *Ixodes spp.*'dir. Ülkemizde *B. ovis* ve *B. motasi*'den ileri gelen babesiosis olguları Van ve yöresinde saptandı. *B. ovis*, 1–1.5x2.5 µ büyüklükte, yuvarlak, oval veya armut şeklinde eritrosit içinde tek veya çift olarak bulunur. *R. bursa*, *I. ricinus* ve *D. reticulatus* başlıca vektörleridir. *B. motasi*, 2.5-5x 2.5 µ büyüklükte, daha çok eritrosit içinde armut formunda bulunur. *Haemophysalis spp.* ve *Rhipicephalus spp.* türü keneler ile bulaşır (Gül, 2002; Bilal, 2005).

2.1.3. Epidemiyoloji

Hastalığın bulaşması ve insidensi kenelerin aktivitesiyle yakından ilgilidir. Keneler rutubetli ortamda ve 26–27 °C’de çok aktiftirler (Gül, 2002).

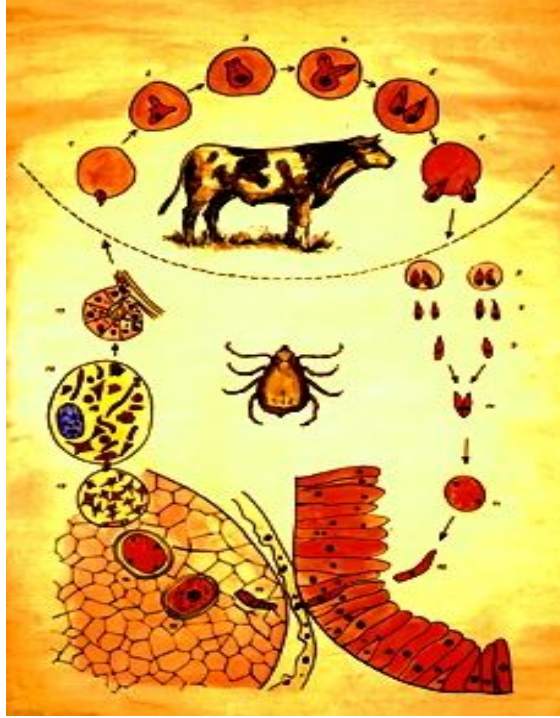
Genellikle koyun, keçi *Babesidae* enfeksiyonları her ırk ve her yaştaki hayvanlarda görülür. Fakat hastalık koyun ve keçilerde şiddetli, kuzu ve oğlaklarda hafif olarak görülür. Hastalık Orta Anadolu’da Haziran ve Temmuz aylarında enzootik bir durum gösterir. Koyunların babesiosisi Makedonya’da da aynı şekilde seyreder (Angelovski ve ark., 1963).

2.1.4. Patogenez

Babesialar kenelerde transovarial ve transtadial olarak nakledilir. Şekil 1’de belirtildiği gibi hasta veya latent enfekte hayvanların kanından alınan *Babesia* etkenleri, kenelerin sindirim kanalında serbest hale geçerek bağırsak epitellerine yerleşir ve çoğaldıktan sonra, karın boşluğuna dökülerek tükürük bezlerine ve ovaryumlara göç ederler. Ovaryumlarda bulunan yumurtalara geçerek nimfleri enfekte ederler. Tükürük bezleri yoluyla kan emerken sağlıklı koyun ve keçileri de enfekte ederler. Perifer kana ulaşan etkenler eritrositler içine yerleşerek ikiye bölünerek çoğalırlar ve eritrositleri hemolize ederler. Hemolize bağlı olarak şiddetli anemi, hemoglobinemi, hemoglobüri ve ikterus oluşur. Hastalığın akut dönemini atlatan koyun ve keçilerde *Babesialar* hemapoetik organlara yerleşerek *Babesia*’ya has bağışıklık (premunite) oluşumuna neden olurlar. Premunite gelişmiş hayvanların eritrositlerinde tek tük *Babesia* saptanabilir (Bilal, 2005).

Enfeksiyonu geçirenler bağışıklık kazandığı için, endemik bölgelerde özellikle kuzu ve oğlaklar kolostrumla yeterince antikor alırlarsa enfeksiyona dayanıklı olurlar. Enfeksiyonu alsalar bile çok hafif atlatarak aktif bağışıklık kazanırlar. Bu bağışıklık eğer enfeksiyon nükseder ise kalıcı olur. Başlangıçta etkili bir sağaltım uygulanmışsa, bağışıklık oluşmadan protozoonlar hastanın kanında bir süre kalır, ondan sonra kaybolurlar. Bu süre 6 ay kadardır, 6 ay boyunca hayvan tekrar duyarlı hale gelir. Bir

yıllık devre hastalığın gizli seyrettiğini gösterir (Alaçam ve Şahal, 1997; İmren ve Şahal, 1997).



Şekil 1. *Babesia*'nın biyolojisi.

2.1.5. Semptomlar

Babesiosis akut, subakut ve kronik seyirli olmakla beraber, pratik koşullarda ateş, anemi, ikterus, ödem ve hemoglobinüri ile karakterize akut formu görülür (Bilal, 2005).

Doğal enfeksiyonlarda 8–10 günlük bir inkübasyon döneminden sonra vücut sıcaklığı aniden 41–42°C'ye kadar yükselir ve genellikle 5–6 gün süreyle yüksek kalır. Bu dönemde durgunluk, iştahsızlık, kalp frekansı ve solunum sayısında artış, süt veriminde gerileme gibi semptomlar ortaya çıkar. *B. motasi* hafif derecede ateşe neden olur. *B. ovis* koyun ve keçilerde görülen daha küçük protozodur (Gül, 2002; Bilal, 2005).

Hastalığın başlangıcından 2–5 gün sonra hemoglobinüri görülür. İdrar sarı kıvımlıtrak-şarap kırmızısı renktedir. Koyunlarda hemoglobinüri nispeten hafiftir.

Hastalığın başlangıcında hiperemik olan görülebilir mukozalar ve konjunktivalar anemik ve ikterik bir görünüm alır (hemolitik icterus). Anemiye bağlı olarak yatma isteği, güçlkle hareket etme, yavaş ve sallantılı yürüyüş, sürünün gerisinde kalma, merada otlamama, çevreyle ilgisizlik, başlarını eğik tutma gibi genel bitkinlik semptomları görülür. Gebe koyun ve keçiler yavru atar. 7–10 gün içinde anemiden ölüm şekillenir. Kıllar ve yapağı normal durumlarını kaybeder, karışık bir hal alır. Piroplazmozun seyri esnasında karaciğer yetmezlikleri, karaciğerin perküsyon sahasında büyüme, ön midelerde atoni ve konstipasyon görülür (Gül, 2002; Bilal, 2005).

Genç hayvanlarda enfeksiyon subakut seyreder, hafif ateş görülmesine karşın, hemoglobinüri yoktur. Subakut ve kronik babesiosis olgularında sadece ateş ve iştahsızlık görülür. Kronik olaylar akut veya subakut olayların devamı sonucu olabilir veya başlangıçtan itibaren kronik seyirlidir. Kronik formlar genellikle zayıflamaya neden olur. Hematolojik bulgular olarak; kan sulu kıvamda, iyi pıhtılaşmaz, plazmada kıvrımtrak renk gözlenir. Eritrosit sayısı ve hemoglobin miktarı azalır (Gül, 2002; İmren ve Şahal 1997).

2.1.6. Nekropsi

Anemi (kaslar solgun), ikterus (deri altı, yağ doku ve serozalar sarı), seroza ve mukozalarda peteşiel kanamalar, karaciğer büyümesi, böbreklerde degenerasyon, idrar kesesinde kırmızı renkte idrar bulunur. Safra kesesi çok dolgun, safra koyu renktedir. Kronik seyirde zayıflama, anemi ve vücut boşluklarında transudat birikimi gözlenir (Gül, 2002).

Dalak büyümüş, şişmiş ve kıvamı yumuşaktır. Böbrekler büyümüş ve rengi koyudur. Ayrıca glomerulonefritis bulguları gözlenir. Epikard altında ve endokartta ekimotik kanamalar, perikardial kesede fazla miktarda kanlı bir sıvı tesbit edilir (İmren ve Şahal, 1997).

Akciğerde ödemler ve küçük kanama odakları bulunur; rengi grimsi pembedir. Trachea ve bronşlarda köpüklü bir sıvı vardır. Bronşial ve mediastial lenf yumruları hafifçe büyümüş ve kesit yüzleri irinlidir. Abomazumda müköz membran kırmızı renkte

olup, küçük kanamalar vardır. Bağırsakların ve bazen de kolonların mukozası hafif hiperemik, bazen hemorajik ve şişkin görünüştedir (Mimioğlu ve Göksu, 1969).

2.1.7. Tanı

Hastalığın akut fazında periferik kandan hazırlanan sürme kan frotilerinin Giemsa ile boyanması ve mikroskopik muayenesinde *Babesialar* görülerek tanı konur. Karaciğer ve kalp kapillar kanından yapılan frotiler ölümden sonra 8. saate kadar iyi sonuçlar verir. Ancak subklinik olguların tanısında farklı serolojik testler ve PCR gibi ileri tanı teknikleri kullanılır. *B. ovis* seroprevalansı ELISA yöntemi ile saptanır. Vektör kenelerde *Babesiaların* değişik gelişme siklusları steromikroskop altında yapılan diseksiyondan elde edilen iç organlarından hazırlanan sürme frotilerin, Giemsa ile boyanması ve immersiyon objektifte muayenesine dayanır. Ayırıcı tanıda, anemi ve ikterus semptomlarıyla seyreden leptospirosis, basiller iktero-hemoglobinüri, antraks, puerperal ikterohemoglobinüri, anaplasmosis ve theileriosis gibi hastalıklar dikkate alınmalıdır (Gül, 2002; Bilal, 2005).

2.1.8. Korunma

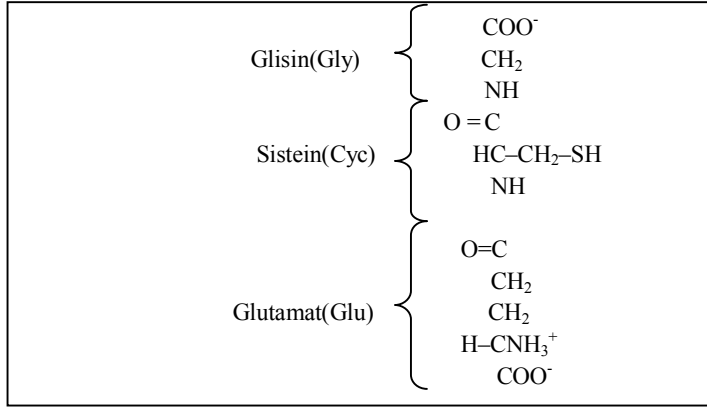
Sürü bazında kene mücadelesi şarttır. Kenelerin aktivite kazandıkları sıcak mevsimlerin başlangıcında (Mayıs sonu) kene banyosu, yıkama veya püskürtme şeklinde ilaçlama şarttır. Meraya çıkan hayvanlarda Flumethrin kullanılır. Ektoparaziter ilaç uygulamaları 4–6 hafta ara ile tekrarlanır. Koyun ve keçiler açısından ideal olanı Mayıs ayında kırkım sonrası yaptırılan kene banyosudur (Bilal, 2005).

2.2. Glutasyon

Glutasyon (GSH), vücudun birçok hücrelerinde bulunan ve hücrenin fonksiyonel proteinlerini oksidan ajanlara karşı koruyan bir tripeptittir (Champe ve Harvey, 1997). Tabiatı yaygın bir şekilde bulunan bu sülfürlü bileşik 1921 yılında Hopkins tarafından keşfedilmiş ve glutamil-sisteinden ibaret bir dipeptit olduğu zannedilmiştir. Ancak 1929

yılında kristal halde elde edildikten sonra yapısının tri-peptit olduğu anlaşılmış ve 1935 yılında δ -L-glutamil-L-sisteinil-glisin halinde sentezlenmiştir (Gözükara, 1997).

GSH, hayvan hücrelerinin hemen hemen hepsinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur (0,1 – 10 mM). Glutasyon disülfid (GSSG), GSH'deki sisteinin tiol grubunun oksidasyonu ile oluşmaktadır. Hücrede bulunan GSH' ın üçte bire yakın miktarı disülfid şeklinde ve tiol grubu içeren sistein, koenzim A gibi bileşikler ile beraber bulunur (Altıntaş, 2006). GSH, DNA sentezinde ve hasarlı DNA parçalarının onarılmasında, metabolik fonksiyonların yerine getirilmesinde, zehirli maddelerin inaktif hale dönüştürülmesinde ve serbest radikallerin olası hasarlarının önlenmesinde görev yapmaktadır (Chavan ve ark., 2005).



Şekil 2. Glutasyonun yapısı (Champe ve Harvey, 1997)

2.2.1. Glutasyonun kimyasal özellikleri

GSH iki peptit bağı, iki karboksilik asit grubu, bir amino grubu ve bir tiol grubundan oluşmuş bir moleküldür. GSH molekülünde çok sayıdaki hidrofilik fonksiyonel grubun düşük molekül ağırlıklı atomlarla birleşmesi bu molekülün su, etanol ve amonyak gibi polar çözücüler içinde kolaylıkla çözünmesine neden olmaktadır (Gözükara, 1997).

GSH' deki en aktif grup tiol grubudur. GSH'daki tiol grubunun oksitlenmesi ile oluşan GSSG, antioksidan özelliğini kaybeder. Tiol grubunun asitliği GSH'nun kendi

anyonu (RS^-) ile sulu çözeltilerde kuvvetlice reaksiyon vermesine sebep olur. Reaksiyonun oluşma sıklığı ortam pH 'sının artışı ile doğru orantılıdır (Altıntaş, 2006).

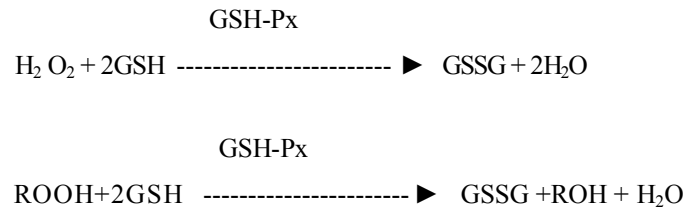
2.2.2. Glutatyonun biyosentezi

GSH sentezi, L-glutamat ve L-sisteinin gama-glutamilsistein sentetaz enziminin katalizlemesi ile başlar. Oluşan gama-glutamilsistein ve L-glisin ürünü GSH sentetaz enziminin katalizörlüğünde GSH'na dönüştürülür. Bu reaksiyonlar esnasında iki ATP harcanır. İlk reaksiyon geri bildirim ile inhibe edilebildiğinden hızı belirleyen basamaktır (Altıntaş, 2006).

2.2.3. Glutatyonun biyolojik fonksiyonları

a. GSH, glutatyon peroksidazın ön maddesidir.

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), H_2O_2 ve organik hidroperoksitlerin (ROOH) indirgenmesini katalizler. Yapısında aktivasyonu için gerekli olan selenyum vardır ve stoplazmada bulunur (Akkuş, 1995).



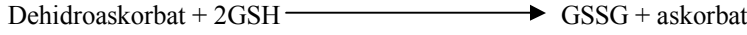
Bu reaksiyonlarda peroksitler indirgenirken redükte glutatyon (GSH) okside olmaktadır. Membran fosfolipid hidroperoksitlerini stoplazmada bulunan fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz enzimi katalizler (Reilly ve ark., 1991, Yalçın, 1998).

GSH-Px'in, fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmelerini önler. GSH-Px aktivitesi

düşük olan makrofajlarda zimosanla başlatılan solunum patlamasını takiben hidrojen peroksidin salınımının arttığı gösterilmiştir. Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar (Akkuş, 1995; Reilly ve ark., 1991)

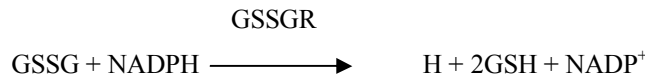
b. GSH, dehidroaskorbat redüktazın ön maddesidir.

GSH, dehidroaskorbat molekülünün dehidroaskorbat redüktaz enzimi katalizörlüğünde indirgenmesi reaksiyonuna katılmaktadır. Bu tepkime iyi bilinen bir antioksidan olan askorbatın meydana gelmesini sağlamaktadır (Luberda, 2005; Altıntaş, 2006).



c. GSH, glutatyon redüktaz tarafından katalizlenen reaksiyonun ürünüdür.

Glutatyon redüktaz (GSSGR) enzimi, reaktif oksijen ürünleri tarafından okside edilen glutatyonu tekrar redükte forma çevirir. Reaksiyon için nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH)'a gereksinim vardır. Enzim, eritrosit, karaciğer ve böbrekte bol bulunur. Prostetik grup olarak 2 adet flavin adenin dinükleotit (FAD) içerir. GSSGR için gereken NADPH'ın büyük kısmı pentoz fosfat geçitinden elde edilmektedir (Reilly ve ark, 1991).



2.3. Hemoglobin

Hemoglobinler globin proteini ile birleşmiş demirli porfirinlerdir. Birbirinden farklı iki çift polipeptid zinciri içerir (Zubay, 1983) ve bunlar allel olmayan farklı genlerle kontrol edilirler (Tucker, 1971). İnsanlarda ve omurgalı hayvanlarda embriyodan itibaren gelişim boyunca embriyonal hemoglobin (Hb Gower), fetal hemoglobin (Hb F) ve ergin hemoglobin (Hb A) görülür (Kleihauer, 1968). Yeni doğan yavru da mevcut olan fetal hemoglobin doğumdan dört ay sonra ergin

hemoglobin haline dönüşür (Lee ve ark., 1971). Embriyonik hayatın başlarında hemoglobinin tetramerik yapısı $\zeta_2\epsilon_2$ şeklinde olup, fetal hayatın seyrinde zeta (ζ)nın yerini alfa (α) ve epsilon (ϵ)nın yerini gama (γ) alır. Alfa ve zeta zincirleri 141; beta, gama ve delta zincirleri 146 aminoasitten kuruludur (Zubay, 1983). Hb A iki alfa ve iki beta zincirlerinden oluşur ($\alpha_2\beta_2$). Diğer bir yetişkin hemoglobini olan Hb A₂, total hemoglobinin yaklaşık olarak %2 sini oluşturur. Hb A₂, Hb A'daki β zincirlerinin yerine delta (δ) zincirlerini içerir ($\alpha_2\delta_2$) (Zubay, 1983). Hemoglobin molekülünün dört polipeptid zincirinin her birinde bir hem vardır. Hem, bir siklik tetrahidropiroldür, hemoglobinin kırmızı renginden sorumludur. Tetrapiroller, düzeysel bir halkada dört α metilen köprüsüyle birbirine bağlanmış dört pirolo molekülünden meydana gelirler. Bu halkanın ortasında bir ferro demir atomu vardır.

Hemoglobin, oksijenle reverzibl olarak birleşme yeteneğine sahiptir, her bir hem bölümü bir molekül oksijen bağlayabilir. Hemoglobin, oksijeni akciğerlerden alarak, periferel dokulara, buradaki CO₂ ve protonları atılmak üzere akciğerlere taşır. Periferel dokularda kaybedilen her dört oksijene karşılık iki proton bağlanır. Kanda taşınan CO₂'nin %15'i hemoglobin molekülünde taşınır (Murray ve ark., 1993). Hemoglobin, üç çeşit allosterik etki gösterir: 1) Bir heme bağlanan oksijen diğer hemlere oksijen bağlanmasını kolaylaştırır. 2) H⁺ ve CO₂, oksijenin hemoglobinden serbest bırakılmasını artırır. Bu etki kas gibi metabolik aktif dokularda oksijenin serbest bırakılmasını artırmada fizyolojik öneme sahiptir. Bunun zıddı olarak akciğerlerin alveoler kılcal damarlarında H⁺ ve CO₂ nin serbest bırakılması, O₂ tarafından artırılır. H⁺, CO₂ ve O₂ bağlanması arasındaki bu allosterik bağlantılar "Bohr etkisi" olarak bilinir. 3) Hemoglobinin oksijene olan affinitesi ayrıca 2,3-difosfoglisarat (2,3-DPG) tarafından regüle edilir. DPG, deoksihemoglobini bağlayabilir, ancak oksihemoglobini bağlayamaz. Böylece hemoglobinin oksijene affinitesi zayıflatılır (Stryer, 1988). 2,3-DPG'ın insan ve diğer memeli türlerinde hemoglobin fonksiyonunu idare ettiği bilinir (Brewer, 1970), ancak koyunda 2,3-DPG'ın oynadığı rol ihmal edilebilir, çünkü koyunda alyuvar 2,3-DPG seviyesi çok düşüktür (<1.0mM/l) ve koyun hemoglobinleri ile 2,3-DPG arasındaki interaksyon çok düşüktür (Agar ve Roberts, 1979).

Hemoglobinin α ve β zincirlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar hemoglobinin biyolojik fonksiyonunu potansiyel olarak etkileyebilirler. İnsanda birkaç yüz mutant hemoglobin bilinmektedir, çoğu selimdir. Biyolojik fonksiyonu değiştirenler arasında hemoglobin M, hemoglobin S, deoksihemoglobin S sayılabilir (Murray ve ark.,1993).

2.3.1. Hemoglobin tiplerinin tespitinde kullanılan elektroforetik yöntemler

Hb varyantlarının tespitinde esasen alkali tampon (pH 8.6-8.8) kullanılır. Destek ortam seluloz asetat, nişasta jel, kağıt, nişasta blok, agaroz veya poliakrilamid jel olabilir.

Selüloz asetat elektroforezi kullanım kolaylığı ve hızlı sonuç vermesi bakımından genel klinik laboratuvarlarca tercih edilen bir metottur.

Nişasta jel elektroforezi hemoglobinlerin daha iyi çözülmelerini sağlar ve özel hematoloji laboratuvarlarında geniş kullanıma sahiptir (Williams ve ark., 1983). Hartl ve Ferrand (1993), nişasta jel elektroforezi kullanarak yabani tavşanda hemoglobin alfa zincirinin polimorfik olduğunu bulmuş ve bu sistemin iki kodominant allelli otozomal bir gen dokusu tarafından kontrol edildiğini bildirmişlerdir. Nişasta jel elektroforezinde asidik tamponun kullanıldığı da olur. Ferrand (1989), kendisinden evvel alkali nişasta jel elektroforeziyle çalışılarak monomorfik kanısına varılan tavşan hemoglobini β zincirinin asit nişasta jel elektroforezi kullanarak polimorfik olduğunu göstermiştir. Elektroforezde asit tamponun kullanılması insanda bazı anormal hemoglobinlerin tespitinde de kolaylık sağlayabilir (Williams ve ark., 1983).

Globin zincir elektroforezi, alkali ve asidik tamponların her ikisinde de benzer mobilite gösteren hemoglobinlerin ayrılmasında kullanışlıdır (Williams ve ark., 1983). Ferranti ve ark., (1991), immobilin poliakrilamid jel elektroforezi uygulayarak bufaloda hemoglobinin hızlı bandı olarak bilinen AA fenotipinin Hb1 ve Hb3 adı verilen iki komponente sahip olduğunu, globin zincir elektroforez analizi sonucunda ise hemoglobin AA fenotipinin üç bant verdiğini ($\beta, \alpha_1, \alpha_3$), bunlardan α_1 , α_3 ve katyonik bantlarının α globin pozisyonunda göç ettiğini bildirmiş, aralarındaki

elektroforetik mobilite farkını birbirinden farklı yüksüz aminoasitlerden köken alan yapısal değişikliklere atfetmişlerdir.

2.3.2. Koyunlarda hemoglobin tipleri

Harris ve Warren (1955), normal yetişkin koyunda farklı göç hızına sahip iki hemoglobin tipi bulmuş, Evans ve ark. (1956), tarafından nişasta jel elektroforezi kullanılarak hızlı göç eden tip Hb A ve diğeri Hb B olarak isimlendirilmiştir. Ashton ve ark. (1967), tarafından bu tiplerin otozomal kodominant (eş-baskın) genler tarafından kontrol edildiği ve AA, AB, BB fenotiplerini oluşturduğu bildirilmiş, Hb AA ve BB nin genotipleri sırasıyla Hb^AHb^A ve Hb^BHb^B sembolü ile gösterilmiştir.

Hb C, Hb D koyunlarda nadiren bulunan tiplerdir. Anemik hayvanda (Vliet ve Huisman, 1964) deneysel olarak aneminin oluşturulduğu koyunlarda (Huisman ve ark., 1958) ve anemik olmayan yetişkin koyunda (Atroshi ve ark., 1979) Hb C nin mevcudiyeti gözlenmiştir. Hb C, elektriksel alanda Hb B ye göre daha yavaş göç eder (Vliet ve Huisman, 1964). Vaskov ve Efremov (1967) tarafından sağlıklı koyunda Hb D tipi bulunmuş ve elektroforetik bakımdan en hızlı bant olduğu bildirilmiştir.

Ülkemizde yetiştirilen Kıvırcık, İmroz, Merinos (Saf kan), Merinos (Yarım kan), Sakız, Dağlıç, Ramlıç, İvesi, Orta Anadolu Merinosu, Karayaka, Akkaraman, Karagül ırkı koyunlarına ait hemoglobin A ve B genlerinin dağılışı sırasıyla 0.075, 0.922; 0.350, 0.650; 0.70, 0.930; 0.40, 0.960; 0.140, 0.860; 0.114, 0.886; 0.150, 0.850; 0.07, 0.993; 0.151, 0.849; 0.140, 0.860; 0.000, 1.000; 0.000, 1.000 şeklinde tespit edilmiştir (Doğrul, 1985). Diğer bir çalışmada Hb^A ve Hb^B frekansları ivesi, Merinos, Karaman ırklarında ve Merinos x Karaman, Merinos x İvesi, Karaman x İvesi Melezlerinde sırasıyla 0.064, 0.936, 0.081, 0.919; 0.031, 0.969; 0.070, 0.930; 0.129, 0.871; 0.042, 0.958, AA, AB, BB fenotiplerinin frekansları Karaman ırkında sırasıyla %0.00, %6.25, %93.75 olarak bulunmuş, AA fenotipi sadece İvesi ve Merinos ırklarında gözlenmiştir (Sosyal, 1983). İvesi, Kıvırcık ve Morkaraman koyunları üzerinde yapılan bir çalışmada

hemoglobin A ve B gen frekansları sırasıyla 0.085, 0.916; 0.079, 0.921; 0.018, 0.982 olarak tespit edilmiş, Morkamanlarda AA fenotipine rastlanmamıştır (Yaman ve ark., 1990). Yine ivesi ve Morkaraman ırklarında yapılan bir araştırmada Hb^A ve Hb^B frekansları sırasıyla 0.214, 0.786; 0.153, 0.846; AB ve BB tipleri sırasıyla %39.6, %60.4; %30.8, %69.2 oranında tespit edilmiş, AA tipine Morkaramanlarda rastlanmamıştır (Yaprak, 1992).

2.3.3. Hemoglobin tiplerinin adaptasyon ve hastalıklara mukavemet üzerine etkisi, fizyolojik farklılıkları

Hemoglobin tiplerinin gen frekanslarının ırklara göre (Doğrul, 1985; Carr, 1964; Osterhoff, 1965; Vicovan ve Rascu, 1989) ve coğrafik dağılıma göre değiştiği yönünde sonuçlar alınması (Agar ve ark., 1972), araştırmacıları hayvanların çevresel şartlara adaptasyonu ve hastalıklara karşı mukavemetinde görülen farklılıkların Hb tipleriyle alakalı olabileceği fikrine götürmüştür.

40° enlemin üzerindeki bölgelerde yaşayan koyunlarda Hb A'nın hakim olduğu bulunmuş, sıcak bölgelerde Hb A'nın dezavantaj oluşturacağı ileri sürülmüştür (Agar ve ark., 1972). Agar ve Seth (1971), bu fikre uygun olarak Hindistan'ın nispeten kurak bölgelerinde Hb B taşıyan koyunların daha iyi adapte olduğunu, Evans ve Blunt (1961), ise koyunlarda Hb A ve Hb AB'nin Hb B'ye göre kuraklık, sıcaklık ve parazitlere karşı avantaj sağladığını bildirmişlerdir. Sharabi ırkı sığırlarda hemoglobin genotipinin vücut ısı ve sıcaklığa karşı tolerans üzerine önemli etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (AI-Timemi ve Murrani, 1990).

İngiltere'nin farklı bölgelerinden 33 koyun ırkında Hb tipleri incelenmiş, deniz seviyesine yakın yerlerde yaşayanlarda hemoglobin A geni düşük, dağlık bölgelerde ise yüksek frekanslarda görülmüştür (Evans ve ark. 1958).

Chan (1968), Dassat (1964), ise dağlık bölgelerde yaşayan koyunlarda Hb B'nin hakim olduğunu bildirmişlerdir. Farklı ırk ve çevresel şartların bu farklı sonuçlarda etken olduğu hatıra gelmektedir. Bir araştırmada yerli Romen

koyunları (Palas Merinos, Transilvanya Merinosu, Spanca, Tsigai, Turcana, Karakul), ithal ırklar (Avustralya Merinosu, Romney Marsh, Drysdale Koriedale, Polwarth, Finnish Landrace) ve et-yapağı, doğurganlık yönünde oluşturulan iki hatta Hb allel frekansları incelenmiş, A allelinin frekansının ithal ırklarda yerli ırklara nazaran önemli derecede yüksek olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada A allel frekansının yaşlılarda gençlere nazaran daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Vicovan ve Rascu 1989). Köken aldığı bölgeden uzaklaştırılarak farklı bir çevreye yerleştirilmesi halinde ırklarda hemoglobin gen frekanslarında zamanla değişiklik meydana gelmektedir (Evans ve Blunt, 1961; Vallejo ve ark., 1978).

Bazı hemoglobin tipleri hayvanların bazı hastalıklara karşı mukavemetinde avantaj sağlamaktadır. Hb A taşıyan koyunların Hb B'ye nazaran anemiye karşı tolerans gösterdiği bulunmuştur (Huisman ve Kitchens, 1968). Bilindiği üzere paraziter hastalıklar hayvanlarda oluşan aneminin kaynağını teşkil edebilmektedir. Bazı hemoglobin tiplerinin hayvanları bazı parazitlere karşı daha dirençli kılması hemoglobin tipi-anemiye tolerans ilişkisi hakkında açıklık getirmektedir. Hemoglobin A taşıyan koyunların B 'ye göre *Haemonchus contortus*'a karşı daha dirençli olduğu bildirilmiştir (Altaif ve Dargie, 1978). *H. contortus* invazyonuna dirençli Florida koyunlarında Hb^A geni frekansı, hemoglobin miktarı ve hematokrit değeri yüksek, buna karşın direncin düşük olduğu Rambouillet koyunlarında Hb^B geni frekansı yüksek, hemoglobin miktarı ve hematokrit değeri düşük bulunmuştur (Jilek ve Bradley, 1969).

Endemik parazitlerin (*Babesia*) yol açtığı anemi ve kurak iklimiyle bilinen Apuha'da Leceese koyunlarında yapılan bir çalışmada hemoglobin fenotipiyle PCV (hematokrit değeri) ve hemoglobin içeriği arasında ilişki tespit edilmiş, Hb B taşıyan koyunların kan vizkositesinin daha düşük ve anemiye karşı toleransının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Pieragostini ve ark., 1993). Anemiye tolerans bakımından farklı Hb tiplerine işaret edilmesi anemiyi oluşturan parazitlerin farklı olmasının getirdiği bir sonuç gibi görünmektedir.

Homozigot hemoglobin tiplerini taşıyan sığırlarda heterozigot tiplilere göre mastitis görülme sıklığının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Pil'ko, 1987).

Hemoglobin tiplerinin kan hacmi ve PCV değerleri (Dawson ve Evans 1965), oksijen affinitesi (Dawson ve Evans, 1962), hipoksiye karşı direnç (Evans, 1966), kanın bakır seviyeleri (Wiener ve ark., 1974), alyuvar potasyum konsantrasyonları (Agar ve ark., 1972, Evans ve ark., 1956) ve eritrosit redükte gutasyon seviyelerini etkilediği bildirilmiştir (Rizzi ve ark.,1988). Bu fizyolojik farklılıkların Hb tipleri ile adaptasyon ve bazı verim özellikleri arasındaki ilişkilerde etken olduğu muhtemeldir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hayvan materyali

Van Özalp İlçesi bir işletmeci elinde bulunan ortalama 1.5–2 yaşlarında parazitolojik ve klinik olarak babesiosis tanısı konulan 50 ve sağlıklı 20 Akkaraman koyun bu çalışmada hayvan materyali olarak kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan alet ve malzemeler

Elektroforez Tankı (Helena Lab- 4063)
Güç kaynağı (Helena Lab -1511)
Sellüloz asetat kartları (Helena Lab - Titan III)
Tüp (Ependorf)
Cam Tüp (Antikoagulantlı)
Spektrofotometre (Perkin-Elmer Lambda 1 A UV \ VIS)
Soğutmalı Santrifuj (Heraeus Sepatech Minifuge RF)
Vorteks (MS2 Minishaker)
Hassas Terazı,(Bosch S 2000)
Otomatik pipet (Socorex micropipette)
Otomatik pipet (Socorex macropipette)
Derin dondurucu (Uğur)
Süzgeç kâğıdı No.42 (Watman)
Plastik santrüfuj tüpleri
Helena Lab – 1261 Dansitometre

3.1.3. Kimyasal maddeler

Giemsa Solusyonu

Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) (Merck)

Sodyum klorür NaCl (Merck)

5,5'ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) (Sigma)

Metafosforik asit (H_2PO_3) (Merck)

Di-sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) (Merck)

Triklor asetik asit (TCA) (Merck)

Glasial asetik asit (CH_3COOH) (Merck)

Sülfosalisilik asit (SSA) (Sigma)

Ponceau S Stain (Merck)

Clear aid (Merck)

Metanol (CH_3OH) (Merck)

Disodyum fosfat (Na_2PO_4) (Merck)

Sodyum sitrat (Sigma)

Electra HR[®] Buffer (Cat. No. 5805)

3.2. Yöntem

3.2.1. Paraziter ve klinik muayene

Beden ısısı 40–42°C olan, anemi, ikterus, görünen mukozalarda peteşiel kanama ve hemoglobinüri semptomları gösteren babesiosis şüpheli koyunların *V.auricularis*'inden kan alınarak sürme kan frotisi hazırlandı. Periferik kandan hazırlanan sürme kan frotileri 5 dakika süreyle metil alkolde tespit edildi. Tespit edilen frotiler % 5'lik Giemsa boya solüsyonu ile laboratuvar ortamında 30 dakika süreyle boyandı ve yıkanıp kurutulduktan sonra immersiyon objektifte muayene edildi. Mikroskopik bakıda eritrositler içinde kenara yakın kısımlarda 1.2–1.5 µm büyüklükte tek veya çift armut formunda ya da daha değişik *Piroplasma* formları görüldü.

3.2.2. Kan örneklerinin alınması ve hazırlanması

Kan örnekleri, her koyunun Vena jugularis'inden kanüllerle doğrudan heparinli 10 cc'lik cam tüplere alındı.

3.2.3. Kan glutatyon analiz metodu

Prensip:

Eritrositlerin bütün non-protein sülfidril grupları, indirgenmiş GSH şeklinde bulunur. 5,5'ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit, sülfidril bileşikleri tarafından redükte edilmiş bir disülfid bileşiğidir. Oldukça sarı renkli anyon oluştururlar. GSH madde miktarı bu sarı bileşiğin 412 nm dalga boyunda optik dansitesi saptanarak değerlendirilir (Beutler ve ark., 1963).

Ayırıcılar:

1. **Presipitasyon solüsyonu (Çöktürücü çözelti):** 1.67 g meta fosforik asit, 0.2 g EDTA sodyum tuzu ve 30 g NaCl tartılarak bir miktar distile suda çözülür. Son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

2. **Fosfat Solüsyonu:** 5.34 g Na_2HPO_4 (disodyum fosfat) tartılarak bir miktar distile suda çözülür. Son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanır. Bu solüsyon küflenmediği sürece kullanılabilir. +4 °C'de saklandığında kristallenme olursa ısıtılarak eritilebilir.

3. **DTNB (Elman's Ayırıcı):** 40 mg DTNB, 1g sodyum sitrat tartılarak bir miktar distile suda çözülür. Son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Deneyin yapılışı:

Tüm kandaki GSH tayini, kan alındıktan sonra 24 saat içinde Beutler ve ark. (1963), bildirdiği metoda göre spektrofotometrik olarak yapıldı.

Bir deney tüpüne, heparinli tüm kandan 200 μl alındı. Üzerine 1.8 ml distile su eklendi. Meydana gelen hemolizat üzerine 3 ml presipitasyon solüsyonu ilave edilerek

karıştırıldı. Beş dakika beklendikten sonra, bu karışım başka bir tüpe süzüldü. Elde edilen süzüntüden 2 ml'si bir başka tüpe aktararak üzerine 8 ml fosfat solüsyonu ve 1 ml DTNB ayırıcı ilave edildi, spektrofotometrede köre karşı 412 nm dalga boyunda absorbanları okundu.

Blank olarak 200 µl distile su alınarak aynı işlemler sırasıyla yapıldı. Standart olarak ise GSH (40 mg\ 100 ml distile su) çözeltisi taze olarak hazırlandı. Bu çözeltiden 200 µl alındı ve yukarıda ki işlemler aynı sıraya göre yapıldı.

Elde edilen sonuçlar mg/dl tüm kan olarak hesaplandı (Anderson, 1998)

3.2.4. Hemoglobin tip tayin metodu

Prensip:

Kanın alyuvarlarında mevcut olan hemoglobinlerin kalıtsal yapıdaki polimorf özelliklerinin, sellüloz asetat kağıtlarında, doğru akım gücü ile ayrıştırılması esasına dayanır (Apaydın, 2006).

Hemolizat hazırlanması:

Hb tip tayini kan hemolizatında yapıldığı için, alınan kan örnekleri 15 dk 3000 rpm'de santrifüj edilerek alyuvarlardan ayrılan ve üstte toplanan plazma, mikro pipet ile her bir örnek için ayrı ve temiz bir pipet ucu kullanılarak ayrılmıştır. Plazmanın tüpte kalan kısmı tamamen uzaklaştırıldıktan sonra dipte kalan alyuvarlar, plazmadan arındırılması için fizyolojik tuzlu su ile yıkanmıştır. Bu amaçla uzun kanüllü bir şırınga yardımı ile tüpün tabanından hafif şiddette fizyolojik tuzlu su verilerek alyuvarlar süspanse edilmiştir. Elde edilen süspansiyon 3 defa serum fizyolojik (%0.9'luk NaCl) ile 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş ve üstte toplanan sıvı, su trombu yardımıyla atılmıştır. Üçüncü yıkamadan sonra serum fizyolojik uzaklaştırılınca hemolizata eşit hacimde distile su (H₂O) eklenmiştir. Elde edilen hemolizatlar elektroforetik analizlerde kullanılıncaya kadar derin dondurucuda -20°C'de saklanmıştır (Aygün, 2006).

Elde edilen hemolizatlarda Hb tip analizleri Yüzüncü Yıl Üniversitesi Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'nda yapıldı.

3.2.5. Sellüloz asetat elektroforezi ile eritrositlerde Hb tiplerinin tayini

Ayırıcılar:

1. **Tampon Solusyonunun Hazırlanması:** pH'sı 8.6–9.0 olan Electra HR® Buffer (Cat. No. 5805) 750 ml distile suda eritildi.

2. **Clear Aid Solusyonu:** Clear aid (Cat. No. 5005) polyethylene glycol içerir. 30 birim glasiyal asetik asit, 70 birim metanol ve 4 birim Clear aid'in karışımı sonucu elde edildi.

3. **Ponceau S Stain:** Bir paket Ponceau S Stain 1 lt distile suda eritildi. % 3.5 triklorasetik asit ve % 3.5 sülfosalisilik asitin sulu solusyonunda 250 ml % 0.50 Ponceau S içerir.

Elektroforetik analizin yapılışı

- Gerekli ayırıcılar hazırlandı.
- Sellüloz asetat kartı, pH'sı 8.6–9.0 olan barbital buffer ve tris içeren tampon solusyonunda (Electra HR Buffer Cat No. 5805) karta negatif yük yüklemek için 20 dakika bekletildi.
- Bekleme sonucunda alınan asetat kartı kurutma kağıdı arasında hafifçe kurutuldu.
- Yürütme tankının + ve – kutuplarının olduğu bölmelere 100'er ml (2/5'i kadar) aynı tampon solusyonundan konuldu. Filtre kâğıdı yardımıyla yürütme tankı ile tampon solusyonu arasında temas sağlandı.
- Senter aplikatör yardımıyla sellüloz asetat kartının sellüloz kısmına 8–10 µl hemolizat uygulandı.

- Sellüloz asetat kartının sellüloz kısmı aşağı gelecek şekilde yürütme tankına konulan filtre kâğıtlarının üzerine yerleştirildi ve üzerine kaymaması için lam bırakıldı.

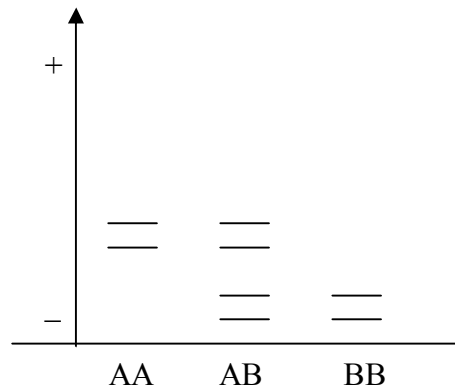
- Yürütme tankının kapağı kapatıldı, 350 V' da 25 dakika bekletildi.

Boyama işlemi

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra sellüloz asetat kartı lam sepetine alınıp, sırasıyla şu işlemlere tabi tutuldu.

- Ponceau S solüsyonunda 6 dakika bekletildi.
- % 5'lik glasial asetik asitte ikişer dakika süreyle üç defa bekletildi.
- % 100'lük metanolde ikişer dakika süre ile iki defa bekletildi.
- 5–10 dakika (7 dakika tercih edilir) süre ile Clear Aid solüsyonunda bekletildi.
- Sellüloz asetat kartı 15 dakika süre ile 50–60 °C'de etüvde bekletilerek, kart şeffaf hale getirildi.

Hemoglobin tiplerinin okunmasında elektroforetik göç hızları dikkate alındı. Üç Hb tipi (AA, AB, BB) ve iki allel Hb^A ve Hb^B saptandı. Aşağıdaki şematik diyagramda görüldüğü gibi hızlı giden tip HbA, yavaş giden ise HbB olarak tanımlandı (Üstdal, 1976, Yur ve ark.,1998).



Şekil 3. Hemoglobin tiplerinin elektroforetik göç hızları

3.3. İstatistik Analiz

Elde edilen tüm veriler t-testi metoduyla istatistiksel olarak yorumlandı.

4. BULGULAR

Babesiosis'li ve sağlıklı Akkaraman koyunlarına ait glutatyon değerleri Çizelge 1'de, hemoglobin tipleri Çizelge 2'de verildi.

Çizelge 1 incelendiği zaman glutatyon seviyesinin, sağlıklı Akkaraman koyununda $22,45 \pm 0,50$ mg/dl iken, babesiosisli hayvanlarda $12,43 \pm 0,40$ mg/dl düştüğü görülmekte olup, bu düşüş ($p < 0.001$) düzeyinde istatistiksel önem gösterdi. Grup içindeki hayvanlara ait glutatyon değerlerinin ortalaması dikkate alınarak yapılan değerlendirmede, hasta ve sağlıklı hayvanların düşük glutatyon ve yüksek glutatyon tipleri arasında önem bulunamadı ($p > 0.05$).

Çizelge 1. Babesiosis'li ve sağlıklı Akkaraman koyunlarının glutatyon değerleri

GSH (mg/dl)			GSH ^h (mg/dl)			GSH ^H (mg/dl)		
n	X $\pm$ SD		n	%	X $\pm$ SD	n	%	X $\pm$ SD
Babesiosis'li Akkaraman koyun								
50	$12,43 \pm 0,40^*$		19	38	$11,23 \pm 0,23$	31	62	$14,30 \pm 0,20$
Sağlıklı Akkaraman koyun								
20	$22,45 \pm 0,50$		11	55	$20,89 \pm 0,29$	9	45	$24,36 \pm 0,61$

* $p < 0.001$, hasta ve sağlıklı grup arasında

$p > 0.05$, gruplar içinde

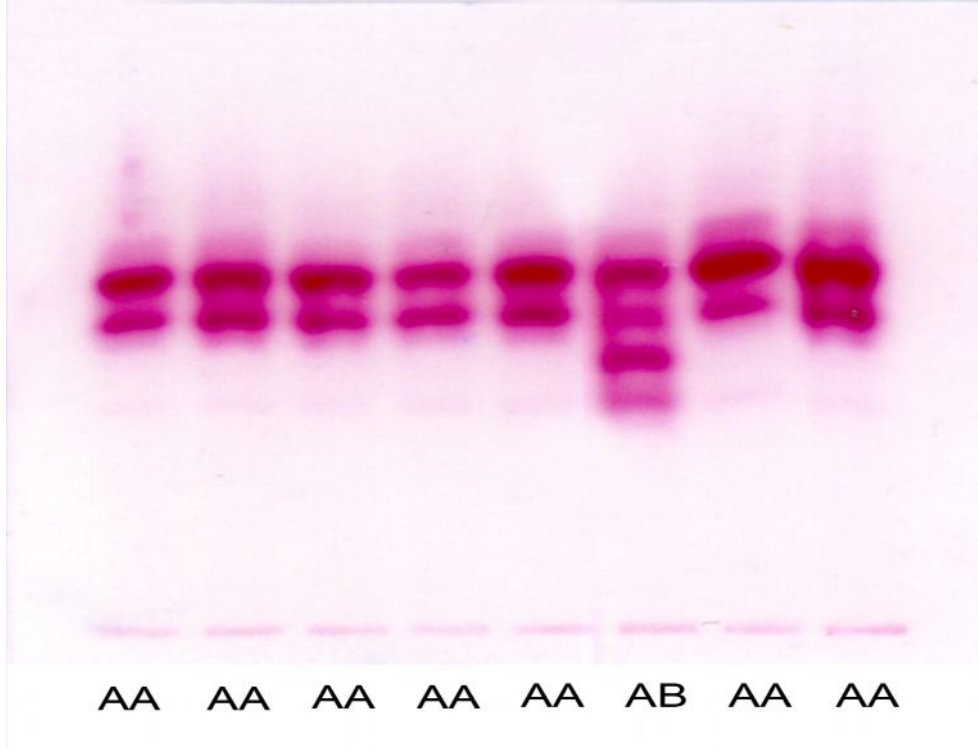
GSH^h: Düşük glutatyon

GSH^H: Yüksek glutatyon

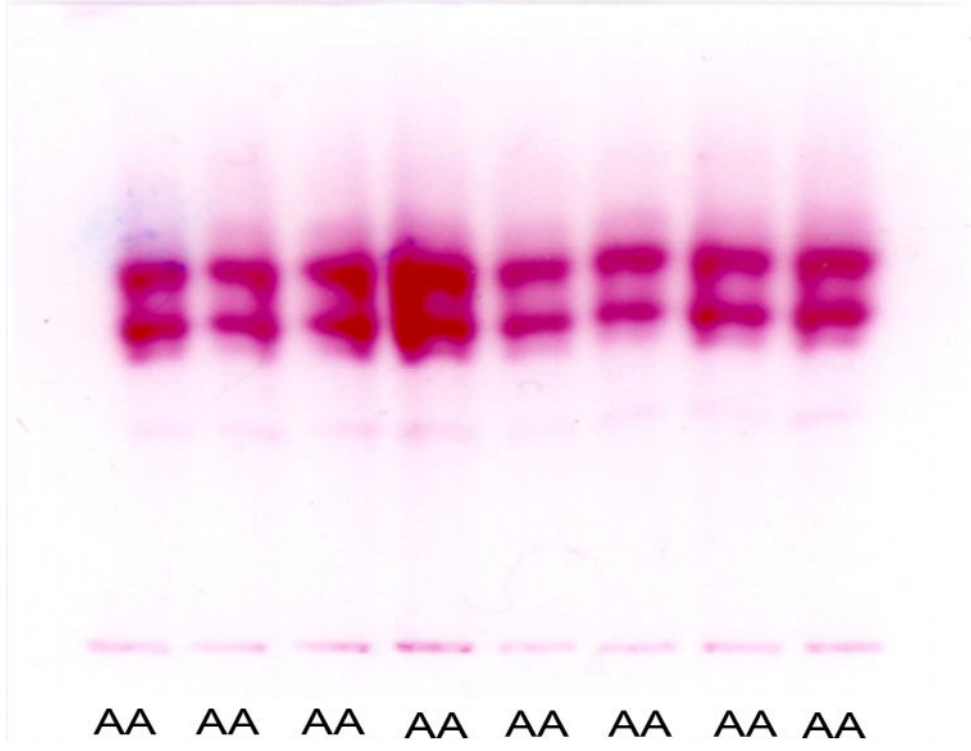
Çizelge 2 hemoglobin tip tayini açısından incelendiği zaman babesiosis'li 50 Akkaraman koyununun 49 tanesinin HbAA, 1 tanesinin HbAB genotipinde olduğu ve HbBB genotipinin bulunmadığı tespit edildi. Sağlıklı hayvanların tamamının ise HbAA genotipine sahip olduğu saptandı.

Çizelge 2. Babesiosis’li Akkaraman koyunları ve sağlıklı Akkaraman koyunlarının hemoglobin tipleri

	n	Hemoglobin Tipleri		
		HbAA	HbBB	HbAB
Babesiosis’li				
Akkaraman	50	49	-	1
koyun		% 98	% 0	% 2
Sağlıklı				
Akkaraman	20	20	0	0
koyun		% 100	% 0	% 0



Şekil 4. Babesiosis'li Akkaraman koyunlarının hemoglobin genotiplerinin elektroforegramı



Şekil 5. Sağlıklı Akkaraman koyunların hemoglobin genotiplerinin elektroforegramı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada Van'ın Özalp İlçesinde bir işletmecinin elinde bulunan, Babesiosisli ve sağlıklı Akkaraman koyunlarının tüm kan glutasyon değerleri ve hemoglobin tipleri tespit edilerek, hasta ve sağlıklı hayvanlar arasında söz konusu parametreler açısından herhangi bir farklılığın olup olmadığı araştırıldı.

Organizmada pek çok önemli fonksiyonlara katılan GSH konsantrasyonunun özellikle koyunda, farklı bimodal dağılım gösteren bir çift otozomal gen tarafından kontrol edildiğine dair çalışmalar yapılmıştır (Rizzi ve ark., 1988; Atroshi, 1979; Reddy ve Krishnan, 1986a; Jain ve ark., 1977). Ancak bu genin etkisinin metabolizmanın çeşitli yerlerinde etki eden çevresel, fizyolojik ve genetik faktörlerden etkilenebildiği bildirilmiştir (Atroshi, 1979; Zanotti-Casatti ve ark., 1990).

Koyunlarda yapılan çalışmalarda glutasyonun genel olarak genetik kontrol altında polimorfik bir yapıya sahip olduğu, yüksek glutasyon düzeyine sahip olan koyunlarda 100 ml eritrosite düşen miktarın 72-96 mg, düşük olanlarda ise 29-31 mg olduğu bildirilmektedir (Emekçi, 2008). Bazı araştırmacılar tarafından, GSH konsantrasyonunun kalıtımla nesilden nesile aktarılabilen bir özellik olduğuna dair çalışmalar yapılmıştır (Best, 1966; Atroshi, 1979; Jain ve ark., 1977). GSH konsantrasyonu farklı hayvan türlerinde, farklı dağılım gösterir. Sığırlarda GSH konsantrasyonu tek bir gen tarafından kontrol edilmekteyken, koyunlarda bimodal dağılım göstermektedir. E.M. Tucker'm sınır olarak belirlediği 55 mg/100 ml seviyesinin üstünde GSH^a sahip olanlar yüksek (GSH^H) altında olanlar ise düşük (GSH^h) olarak nitelendirilmektedir (Atroshi, 1979). Buna göre, Massese ırkında Rizzi ve ark., (1988), Fin ırkında Atroshi (1979), Merinos ırkında Kalaycıoğlu (1984), Yaman ve ark. (1987a) ve Yaman ve ark. (1987b), Ramlıç ırkında Çamaş ve ark. (1987) ve Mandya-Madras koyunları ve bunların melezlerinde Reddy ve Krishnan (1985) ve Reddy ve Krishnan (1986b), glutasyon konsantrasyonunun bimodal dağılım gösterdiğini ve bir çift gen tarafından idare edildiğini bildirmektedirler.

Hayvanların sahip oldukları genetik özelliklerin, GSH konsantrasyonu üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda HbAA fenotipine sahip olan koyunlarda (Rizzi ve ark., 1988, Thiagarajan ve GovindaRao, 1993a, Thiagarajan ve

GovindaRao, 1993b) ve TfBC fenotipine sahip olanlarda GSH konsantrasyonunun daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır (Atroshi, 1979). Ancak, Zanotti-Casati ve ark. (1990), GSH konsantrasyonunun genetik markerlerden etkilenmediğini, sadece çevresel ve fizyolojik şartlardan etkilendiğini ileri sürmektedirler.

Kan parazitleri eritrositlerde hasara ve buna bağlı olarak gelişen oksidatif stresin bir sonucu olarak lipit peroksidasyonuna neden olmaktadırlar. Babesia türleri eritrositleri hemoliz ederek anemiye neden olur. Lipit peroksidasyonu antioksidan sistemlerin miktarını azaltır. Parazitlerin neden olduğu lipit peroksidasyonuna karşı hücreleri korumakla görevli olan antioksidan sistemler vardır (Dede ve ark., 2000; Biçek ve ark., 2005)

GSH, serbest radikal artışına ve lipit peroksidasyonu oluşumuna bağlı olarak meydana gelen ürünlerle kolayca reaksiyona girerek, metabolizma için zararlı olan bu ürünlerin ortamdaki uzaklaştırılmasında görevli güçlü bir antioksidandır (Anderson, 1998).

Çalışmamızda, babesia türleri ile enfekte 50 Akkaraman koyununun glutatyon düzeyleri, ortalama $12,43 \pm 0,40$ mg/dl ve 20 adet sağlıklı Akkaraman koyununun glutatyon düzeyleri, ortalama $22,45 \pm 0,50$ bulundu. Hasta hayvanlar için $12,43 \pm 0,40$ mg/dl ve sağlıklı hayvanlar için $22,45 \pm 0,50$ mg/dl'yi sınır kabul ederek, bu değer ve altı düşük glutatyon tipli (GSH^h), bu değer üzerinde olanları yüksek glutatyon tip (GSH^H) olarak belirledik. Bu ayrıma göre hasta hayvanların % 38'nin GSH^h 'na (ortalama $11,23 \pm 0,2273$ mg/dl n=19) ve % 62'sinin GSH^H 'na (ortalama $14,30 \pm 0,20$ mg/dl n= 31) sahip olduğu bulundu. Sağlıklı hayvanların, % 55'nin GSH^h (ortalama $20,89 \pm 0,29$ mg/dl n=11) ve % 45'nin GSH^H (ortalama $24,36 \pm 0,61$ mg/dl n=9) olduğu tespit edildi. Bu sonuçlara göre hasta ve sağlıklı hayvanların GSH düzeyleri arasında istatistiksel olarak önem saptandı ($p < 0.001$). Ancak gerek hasta gerekse sağlıklı bireyler arasında grup içinde yüksek ve düşük GSH tiplerinde istatistiksel önem bulunamadı ($p > 0.05$).

Biçek ve ark. (2005), babesia türleri ile enfekte koyunlarda bazı biyokimyasal ve kan parametreleri üzerine yaptıkları çalışmada, GSH değerinde kontrol grubuna göre hasta hayvanlarda önemli oranlarda düşme olduğunu saptadılar.

Dede ve ark. (2000), bazı endoparazitlerle (*Fasciola sp.* + *Trichostrongylidae sp.* + *Eimeria sp.*) enfekte koyunlarda tüm kan glutasyon ve serum vitamin C düzeylerini araştırdıkları çalışmalarında, bakılan parametrelerin parazitli grupta , kontrol grubuna göre önemli ($p<0.05$) oranda azaldığını tespit ettiler.

Eritrosit lipit peroksidasyonunun araştırıldığı bir başka çalışmada, Bhabani ve ark. (1999), kontrol grubu ile akut *Malaria Falciparum* 'lu hasta grup arasında eritrosit GSH miktarı bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark olduğunu, hasta gruptaki GSH düzeylerinin anlamlı derecede düştüğünü buldular.

Babesia türleri eritrositler içinde gelişerek çoğalan ve eritrosit yıkımı ile lipit peroksidasyonuna neden olan endoparazitlerdir. Çalışmamızda, hasta grubun GSH seviyesinin, sağlıklı hayvanlara göre anlamlı düzeyde düşük ($p<0.001$) bulunması lipit peroksidasyonu ile ortaya çıkan zararlı ürünlerin arttığını gösterir.

Hayvanların sahip oldukları genetik karakterlerin, onlara bazı hastalıklara karşı dirençli olmaları açısından olumlu getirilerinin olduğuna dair çalışmalar yapılmıştır. Bazı hemoglobin tipleri hayvanların bazı hastalıklara karşı mukavemetinde avantaj sağlamaktadır. HbA taşıyan koyunların HbB'ye nazaran anemiye karşı tolerans gösterir (Huisman ve Kitchens, 1968). Bilindiği üzere paraziter hastalıklar hayvanlarda oluşan aneminin kaynağını teşkil edebilmektedir. Bazı hemoglobin tiplerinin hayvanları bazı parazitlere karşı daha dirençli kılması hemoglobin tipi-anemiye tolerans ilişkisi hakkında açıklık getirmektedir. HbA taşıyan koyunların B 'ye göre *Haemonchus contortus*'a karşı daha dirençli olduğu tespit edildi (Altaif ve Dargie, 1978). *H. contortus* invazyonuna dirençli Florida koyunlarında Hb^A geni frekansı, hemoglobin miktarı ve hematokrit değeri yüksek, buna karşın direncin düşük olduğu Rambouillet koyunlarında Hb^B geni frekansı yüksek, hemoglobin miktarı ve hematokrit değerinin düştüğü saptandı (Jilek ve Bradley, 1969).

Endemik parazitlerin (babesia) yol açtığı anemi ve kurak iklimiyle bilinen Apuha'da Leceese koyunlarında yapılan bir çalışmada hemoglobin fenotipiyle PCV (hematokrit değeri) ve hemoglobin içeriği arasında ilişki tespit edilmiş, Hb B taşıyan koyunların kan vizkositesinin daha düşük ve anemiye karşı toleransının

daha yüksek olduğu bildirildi (Pieragostini ve ark., 1993). Anemiye tolerans bakımından farklı Hb tiplerine işaret edilmesi anemiyi oluşturan parazitlerin farklı olmasının getirdiği bir sonuç gibi görünmektedir.

Homozigot hemoglobin tiplerini taşıyan sığırlarda heterozigot tiplilere göre mastitis görülme sıklığının daha yüksek olduğu görülmektedir (Pil'ko, 1987).

Bu çalışmada, 50 Adet babesiosisli Akkaraman koyunun, 49 tanesi HbAA genotipinde, 1 tanesi HbAB genotipinde bulundu ve HbBB genotipi tespit edilemedi. 20 Adet sağlıklı Akkaraman koyununun tamamının HbAA genotipinde olduğu tespit edildi (Çizelge 2). Bu sonuçlara dayanarak babesia enfeksiyonuna direnç gösteren veya yatkın olan Hb tipinin varlığını gösterebilmek ve kesin sonuca varabilmek için daha ileri ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu kanısına varıldı.

Kısaca bu çalışmamızdan elde ettiğimiz verileri şu şekilde özetleyebiliriz:

1. Hasta ve sağlıklı gruplar arasında GSH açısından önemli fark bulundu.
2. GSH hastalarda düşük bulundu.
3. Bunun nedeni olarak lipid peroksidasyonunda artması ile birlikte koruyucu olarak GSH'nun harcandığı düşünülebilir.
4. Hb tip olarak sadece bir tane hasta hayvanda HbAB genotipi saptandı.
5. Diğer hasta hayvanlar ve sağlıklı hayvanların tamamının HbAA genotipinde olduğu tespit edildi.
6. Bu durumda hastalığa direnç veya yatkınlık açısından akkaraman koyunlarda Hb genotipinin önemini ortaya koymak için daha geniş çalışmalara ihtiyaç olduğu kanısına varıldı.

ÖZET

Şanlı Ü, Babesiosisli koyunlarda hemoglobin tipleri ve glutatyon düzeylerinin araştırılması, Y. Y. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Van, 2008. Van'ın Özalp İlçesinde bir işletmecinin elinde bulunan, babesiosisli ve sağlıklı Akkaraman koyunları üzerinde yapılan bu çalışmada, hemoglobin tipleri ve glutatyon düzeyleri tespit edilerek herhangi bir farklılığın olup olmadığı araştırıldı. Koyunlardan usulüne uygun şekilde kan örnekleri alındı. Tüm kanda glutatyon düzeyleri, çıkarılan hemolizatta ise hemoglobin tipleri saptandı. Glutatyon değerleri sağlıklı koyunlarda ortalama 22,45 mg/dl, hasta hayvanlarda ortalama 12,43 mg/dl saptandı ve istatistiksel olarak ($p < 0.001$) önemli farklılıklar bulundu. Elde edilen ortalama GSH düzeyi düşük ve yüksek GSH için referans kabul edildi. Sağlıklı ve hasta hayvanların GSH^H ve GSH^h yüzdeleri arasında fark bulunamadı. Sağlıklı koyunların hemoglobin genotip % frekansı HbAA=100, HbBB=0, HbAB=0, hasta koyunların hemoglobin genotip % frekansı HbAA=98, HbBB=0, HbAB=2 olarak saptandı. Sonuç olarak parazitik hastalıklarda düşük glutatyon düzeyi genetik bir marker olmaktan ziyade antioksidan bir parametre olduğu ve babesia enfeksiyonuna direnç gösteren veya yatkın olan Hb tipinin varlığını gösterebilmek ve kesin sonuca varabilmek için daha ileri ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Glutatyon, Hemoglobin, Akkaraman Koyun, Babesia

SUMMARY

Şanlı Ü, Investigation of hemoglobin types and glutathione levels in Babesia infected sheep, Y.Y.Ü. Health Science Institute Department of Biochemistry, The Thesis of Master of Science, Van, 2008.

In this study, it has been investigated determination of hemoglobin types and glutathione levels and whether there are any differences between in Babesia infected and healthy Akkaraman sheep originated from Van- Özalp region. The blood samples were collected from infected and healthy sheep. The reduced glutathione levels were analyzed whole blood, and hemoglobin types were determined blood hemolysate. The reduced glutathione levels were determined in healthy and Babesia infected sheep 22,45 mg/dl, 12,43 mg/dl, respectively. The statistically important difference were obtained ($p<0.001$). Obtained average GSH levels were assigned reference for GSH^H and GSH^h , according to this parameters, there are no difference between healthy and infected sheep. The hemoglobin phenotype frequencies were established in healthy sheep HbAA=100, HbBB=0, HbAB=0, and, in infected sheep HbAA=98, HbBB=0, HbAB=2. Finally it is concluded that in the parasitic illnesses lower level of glutathione is an antioksidant parametre rather than being a genetic marker and in order to reach a clear cut conclusion and show the subsistence of Hb type that resists or resembles the babesia infection, further studies are needed.

Key Words: Glutathione, Hemoglobin, Babesia, Akkaraman sheep

KAYNAKLAR

- Agar NS and Roberts J (1979). Biochemical Polymorphism and the 2,3-difosfogliserate in sheep red blood cells, *Experientia.*, 33, 3, 300-301.
- Agar NS and Seth ON (1971). Haemoglobin Polymorphism in Some Sheep Breeds in Himalayan Region, *Amer. J. Veter. Res.*, 32, 361-362.
- Agar NS, Evans JV and Roberts J (1972). Red Blood Cell Potassium and Haemoglobin Polymorphism in sheep. A Review, *Anim. Breed. Abstr.*, 40, 3, 407-436.
- AI-Timemi YK and Murrani WK (1990). Transferrin and Hb Types in Iraqi Local Charabi and Fnesian Cattle in Iraq and Some Production and Adaptation Traits, *Anim. Bred. Abst.*, 59-8181.
- Akkuş İ (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, Mimoza yayınları, Konya
- Alaçam E ve Şahal M (1997). Sığır Hastalıkları. Medisan Yayınları, Ankara, 151–153.
- Altıntaş S (2006). Kahramanmaraşta bazı iş kollarında çalışan boya işçilerinde plazma ve eritrosit membranı sialik asit, glutatyon, plazma nitrikoksit ve lipid peroksidasyonu düzeylerinin değerlendirilmesi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Altaif KI and Dargie JD (1978). Genetic resistance to helminths. The influence of breed and haemoglobin type on the response of sheep to primary infections with *haemonchus contortus*, *Parasitol.*, 77, 161-175.
- Anderson ME (1998). Glutathione an overview of biosynthesis and modulation, *Chem. Biol. Interact.*, 111, 112, 1–4.
- Angelovski T, Petrovic Z and Tomcova D (1963). Piroplasmosis in sheep in Macedonia. *Vet. Glasn.*, 17, 861–867 (Ref: *Vet. Bull.* 34, 6, 329, 1964).
- Apaydın B (2006). Babesiosisli koyunlarda serum proteinlerinin elektroforetik incelenmesi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van.
- Ashton GC, Gilmour DG, Kiddy CA and Kristjansson FK (1967). Proposals on nomenclature of protein polymorphisms in Farm livestock, *Genetics.*, 56, 353-363.
- Atroshi F (1979). Phenotypic and genetic association between production/reproduction traits and blood biochemical polymorphic characters in finnsheep. Thesis, Faculty of Agriculture, University of Helsinki, Finland.

- Atroshi F, Lindstöm G and Österberg S (1979). Abnormal Haemoglobin in Finnsheep, Med. Biol., 57, 66-67.
- Aygün T (2006). Norduz keçilerinde kan proteinleri polimorfizmi ile kimi süt verim özellikleri arasındaki ilişkiler, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Van.
- Başpınar H, Yaman K, Camaş H, Gökçen H, Erdinç H (1987). Merinos koyunlarda hemoglobin tipleriyle bazı yapısal özellikleri arasındaki ilişki üzerinde araştırmalar. Uludağ Üniv. Vet. Fak. Derg., 5-6 (1,2, 3), 29-34.
- Best EE (1966). Blood Glutathione of The Domestic Fowl. Ph. D. Dissertation. University of Sydney, Australia.
- Beutler E, Dubon O and Kelly BM (1963). Improved method for the determination of blood glutathione, J. Lab. Clin. Med., 61, 882-888.
- Bhabani SD and Nalini KN (1999). Evidence for erythrocyte lipid peroxidation in acute falciparum malaria. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene Volume 93., Issue 1., 58-62
- Biçek K, Değer Y ve Değer S (2005). Some biochemical and haematological parameters of sheep infected with *Babesia*, Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg., 16 (1). 33-35
- Bilal T, (2005). Koyun ve keçilerin iç hastalıkları ve beslenmesi, İ Ü Vet. Fak. Derg., 24, 108-110.
- Brewer GJ (1970). Red Cell Metabolism and Function, Plenum Press, NewYork.
- Carr WR (1964). The Haemoglobins of indigenous breeds of cattle in central Africa. Rhod. J. Agric. Res., 2, 93-98.
- Champe PC and Harvey RA (1997). Biyokimya , Lippincott's Illustrated reviews serisinden ,(Tokullugil AH, Dirican M , Ulukaya E çeviri editörleri), Nobel Tıp Kitabevleri Ltd şti, İstanbul, 147-156.
- Chan G (1968). Haemoglobin types and concentrations of red sell and plasma potassium and sodium in sheep at altitude, Quart. Rev. Vet. Inst. Trop. High Altitude Res., July/Dec, 7/8, Lima, Peru.
- Chavan S, Sava L, Saxena V, Pillai S, Sontakke A and Ingole D (2005). Reduced glutathione: Importance of specimen collection. Ind. J. Clinic. Bioch., 20 (1),150-152.
- Curasson G (1943). Traite de Protozoologie Veterinaire et Comparee. III. Vigot Freres, Editeurs, Paris.
- Çamaş H, Başpınar H, Antaplı M, Oğan C ve Şener E (1987). Ramlıç dişi toklularda yapısal verimi özellikleri ile glutatyon düzeyleri arasındaki ilişki. U.Ü. Vet. Fak. Derg., 5-6 (1-2-3), 175-180.

Dassat P (1964). Investigations on haemoglobin polymorphism and potassium types in Langhe Sheep, Atti Ass. Genet., Ital. 9, 146-152.

Dawson TJ and Evans JV (1962). Haemoglobin and erythrocyte types Potassium in sheep and their influence on oxygen dissociation and haemoglobin denaturation, Austr. J. Biol. Sci., 15, 371-378.

Dawson TJ and Evans JV (1965). Effect of haemoglobin types on the cardiorespiratory system of sheep, Amer. J. Physiol., 209. 593-598.

Dede S, Değer Y, Değer S ve Alkan M (2000). Bazı endoparazitlerle (*Fasciola* sp.+*Trichostrongylidae* sp.+*Eimeria* sp.) enfekte koyunlarda lipid peroksidasyonu ve antioksidan durumunun saptanması. T. Parazitol. Derg.,24 (1), 190-193.

Değer Y, Dede S, Kahraman T, Değer S, Ormancı N, Biçek K (2001). Babesiosisli koyunlarda lipid peroksidasyonu, nitrik asit oksidasyon ürünleri ve antioksidan durumunun saptanması. Türk. Parazitol Derg., 25 (1): 25-27.

Değer Y (1996). Kan serumundaki biyokimyasal parametrelere (Bazı spesifik karaciğer enzimleri, bakır, kobalt) dayanılarak Van yöresi koyunlarında paraziter invazyonların erken teşhis imkanları ile oluşan anemi şekillerinin ve sebeplerinin araştırılması, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Tezi, Van.

Doğrul F (1985). Çeşitli koyun ırklarında transferrin ve hemoglobin tiplerinin dağılımı üzerine araştırma, Etlik Vet. Mikrob. Enst. Derg., 5, 8-9, 61-75.

Emekçi S (2008). Norduz keçilerinde hemoglobin,eritrosit potasyum ve glutatyon tiplerinin araştırılması. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Entitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van

Enigk K (1956). Die Schafpiroplsmose in Deutschland. Dtsch. Tierarztl. Wschr., 63, 161-162.

Evans, JV (1966). Red Cell Electrolytes and Haemoglobin. Proc. XIth. Int. Congr. Soc. Haemat, Sydney, Aust., 1, 278-293.

Evans JV, Harris H and Warren FL (1958) Distribution of haemoglobin and blood potassium types in british breeds of sheep. Proc, R. Soc. Ser. B., 149, 249-262.

Evans JV, King JWB, Cohen BL, Harris H and Warren FL (1956). Genetics of haemoglobin and blood potassium differences in sheep, Nature., 178, 849-850.

Evans JV and Blunt MH (1961). Variation in the gene frequencies of potassium and haemoglobin types in ramney marsh and southdown sheep established away from their native evironment, Austr. J. Biol. Sci., 14, 100-108.

Ferrand N (1989). Biochemical and genetic studies on rabbit hemoglobin. I. electrophoretic polymorphism of the β Chain. Bioch. Genetics., 27, 11-12, 673-

678.

Ferranti P, Luccia AD, Malorni A, Pucci P, Ruoppolo M, Marino G and Ferrara L (1991). River Buffalo (*Bubalus Bubalis* L.) AA Phenotype Haemoglobins: Characterization by Immobilized Polyacrylamide Gel Electrophoresis and High Performance Liquid chromatography and Determination of the Primary Structure of the Constitutive Chains by Mass Spectrometry, *Comp. Biochem. Physiol.*, 101, (1-2), 91-98.

Göksu K (1967). Yerli koyunlarımızda Babesidae ve Theileridae'lerin epizootolojik durumlarıyla biyolojilerine dair araştırmalar, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 205.

Gözükara EM (1997). Biyokimya. Evin Matbaası, İstanbul.

Gül Y (2002). Geviş Getiren Hayvanların İç Hastalıkları. Medipres Yayınları, Malatya, 266-268.

Güralp N, Simms BT (1960). Bionomics of *Fasciola gigantica* in Turkey. A.Ü. Vet. Fak. Derg., Cilt. VII No 1-2.

Güralp N, Simms BT (1964). *Fasciola gigantica* and fascioliasis in Turkey. Am. J. Vet. Res., 25, 104, 196-210.

Harris H and Warren FL (1955). Occurrence of electrophoretically distinct haemoglobins in ruminants, *Biochem. J.*, 60, 29.

Hartl GB ve Ferrand N (1993). Genetic polymorphism of transferrin (TF) and the haemoglobin (HBA) in the Brown Hare (*Lepus Europaeus*), *Anim. Genet.*, 24, 439-440.

Huisman THJ, VanVliet G and Sebens T (1958). Sheep hemoglobins, *Nature.*, 182, 171.

Huisman THJ and Kitchens J (1968). Oxygen equilibria studies of the hemoglobins from normal and anemic sheep and goats, *Am. J Physio.*, 213, 140-146.

İmren HY, Şahal M (1997). Sığır Hastalıkları, Kan ve Kan Yapan Organ Hastalıkları, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Medisan Yayınları, Birinci Baskı, Bursa.

Jain AK, Joshi SC, Rawat JS and Pandey MD (1977). Blood glutathione polymorphism and its relationship with certain economic traits in poultry, *Vet. Bull.*, (1979), 049-1026.

Jilek AF and Bradley RE (1969). Hemoglobin types and resistance to haemonchus contortus in sheep, *J. Vet. Res.*, 30, 1773-1778.

Kalaycıoğlu L (1984). Konya Zootekni Araştırma Enstitüsü. Merinos koyunlarında eritrosit glutatyon değerleri üzerinde araştırmalar. S. Ü. Vet.

Fak. Derg., Özel Sayı, 141-147.

Kettle DS (1995). Medical and Veterinary Entomology. Second Ed. Cab. International, UK

Kleihauer E (1968). Embryonic hemoglobins of different animal species, Molec. Gen. Genet., 101, 59-69.

Kretzschmar M, Klinger W (1990). The Hepatic Glutathione System: Influences of Xenobiotics. Exp Pathol., 38: 145-164.

Lee C, Odell G, Anderson I and Jones E (1971). Postnatal loss of bovine fetal hemoglobin, Am. J Vet. Res., 32, 1039-1044.

Lee J, Haris PM, Sinclair BR and Treloar BP (1993). Whole Body Metabolism of Cystein an Glutathione and Their Utilization in The Skin of Romney Sheep: Consequences for Wool Growth. J Agricul Sci., 121: 111-124.

Luberda Z (2005). The role of glutathione in mammalian gametes. Reproduc. biol., 5 (1), 5-17.

Meister A (1984). New Aspects of Glutathione Biochemistry and Transport: Seletective Alteration of Glutathione Metabolism. Nutri Rew., 42: 397-410

Mehmetoğlu İ (2002). Klinik Biyokimya Laboratuvarı El Kitabı, Konya.

Mert N, Gündüz H, Ekin S (1997). Farklı ırk koyunlarda serum protein düzeylerinin elektroforez ile saptanması. Y Y Ü Vet Fak. Derg., 8 (1-2): 28-30.

Mimioğlu M, Göksu K (1969). Veteriner ve Tıbbi Protozooloji II, A.Ü.Vet. Fak., Ankara.

Murray RK, Mayes PA, Granner DK and Rodwell VW (1993). Harper'in Biyokimyası, Çev. Menteş, G., Ersoz, B., Barış Kitapevi/Appleton&Lange, Istanbul.

Osterhoff DR (1965). Hemoglobin variation in Zebu Type cattle. Immun. let., 4, 89.

Özcan C (1961). Ankara ve civarında evcil hayvanlarda piroplasmose vakaları ve tedavileri üzerinde araştırmalar, Tez, A. Ü. Vet. Fak., 143.

Pieragostini E, Dario C and Bufano G (1993). Hemoglobin phenotypes and hemotological factors in Leccese Sheep, Small Rum. Res., 13, 177-185.

Pil'ko VY (1987). Evaluation of some selection traits in a herd of cattle in relation to heterozigosity at 4 loci controlling blood protein types. Anim. (1987). Breed. Abst., 55-7489.

Radostits OM, Blood DC and Gay CC (1995). Veterinary Medicine. Bailliere&Tindall. England.

- Reddy VVC and Krishnan AR (1985). Relationship of erythrocyte reduced glutathione level with growth traits in sheep. *Cherion.*, 259-265
- Reddy VVC and Krishnan AR (1986a). Genetics of erythrocyte reduced glutathione in sheep. *Ind. j. Anim. Sci.*, 56, 434- 439.
- Reddy VVC and Krishnan AR (1986b). Influence of Erythrocyte Reduced Glutathione Types on Certain Reproduction Traits in Sheep. *Ind. j. Anim. Sci.*, 56, 141-144.
- Reilly PM, Schiller HJ and Bulkley GB (1991) Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am. J. Surg.*, 161 (4), 448-503
- Rizzi R, Caroli A, Bolla P, Acciaioli A and Pagnacco G (1988). Variability of reduced glutathione levels in massese ewes and its effect on daily milk Production, *J. Dairy Res.*, 55, 345-353.
- Sosyal İ (1983). Atatürk Üniversitesi Koyun Populasyonunun Bazı Kalıtsal Polimorfik Kan Proteinleri Bakımından Genetik Yapısı ve Bu Biyokimyasal Karakterler ile Çeşitli Verim Özellikleri Arasındaki İlişkiler, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Erzurum.
- Stryer L (1988). *Biochemistry*, 3rd Ed., W.H. Freeman and Company, New York.
- Thiagarajan R and Govinda Rao R (1993a). Interrelationship of 2,3-diphosphoglycerate, glutathione and haemoglobin types in madras red sheep. *Ind. Vet. J.*, 70, 653-656.
- Thiagarajan R and Govinda Rao R (1993b). 2,3 diphosphoglycerate and glutathione levels and haemoglobin types in normal type in normal and anemic sheep. *Ind. Vet. J.*, 70, 745-748.
- Tucker EM (1971). Genetic variation in the sheep red blood cell., *Biol. Rev.*, 46, 341-386.
- Tüzdil AN (1936). *Mezbahalara Mahsus Parazitoloji*, Ahmet İhsan Basımevi, Ltd., İstanbul.
- Üstüdal KM (1976). Türkiye'deki bazı yerli sığır ırklarında hemoglobin, transferrin ve süt proteinlerinin biyokimyasal polimorfizmi üzerinde araştırmalar, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.
- Vallejo M, Monge E and Zarazago I (1978). Genetic adaptation of Non indigenous breeds of sheep in Spain, *Anim. Breed. Abst.*, 47, 11, 6632.
- Vaskov B and Efremov G (1967). Fourth Haemoglobin Type in Sheep, *Nature.*, 216, 593-594.
- Vicovan G and Rascu D (1989). Types of haemoglobin in sheep related to

environmental adaptation, Arch. Zootech., 1, 33-44.

Vliet G van and Huisman TH (1964). Changes in the haemoglobin types of sheep as a response to anemia, Biochem. J., 93, 401-409.

Wiener G, Hall JG, Hayter S, Field AC and Suttle NF (1974). Relationships between haemoglobin type and copper concentrations in whole blood and its components in Ssheep of different breeds, Anim. Prod., 19, 291-299.

Williams WI, Beutler E, Ersleu AJ and Lichthman MA (1983). Hematology, 3 rd Ed., Me Graw-Hill Book Company, New York.

Yalçın AS (1998). Antioksidanlar. Klinik Gelişim., 11, 342-346

Yaman K, Mert N, Cengiz F and Tanrıverdi M (1990). Farklı İrtifalarda Yetiştirilen Yerli Koyunlarda Hemoglobin Tipleri, Potasyum Tipleri ve Hematokrit Değerler Üzerinde Araştırmalar. U.Ü. Vet. Fak. Derg., 9, (1-2-3), 111-119.

Yaman K, Başpınar H, Erdinc H, Çamaş H ve Gökçen H (1987b). Merinos kuzularda glutatyon düzeyleri ile bazı yün özellikleri arasında ilişki üzerinde araştırmalar. U.Ü. Vet. Fak. Derg., 5-6 (1-2-3), 169-173.

Yaman K, Çamaş H, Erdinç H, Gökşen H ve Başpınar H (1987a). Merinos erkek kuzularda bazı kan parametreleri (transferrin, hemoglobin, glutatyon, testosteron) ile besi performansı arasındaki ilişki üzerinde araştırmalar. III. glutathione (GSH) düzeyi ile canlı ağırlık artışı arasındaki ilişki. U. Ü. Vet. Fak. Derg., 5-6 (1-2-3), 67-71.

Yaprak M (1992). İvesi ve Morkaraman koyunlarında bazı kan karakterleri ile çesitli verim özellikleri arasındaki ilişkiler, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.

Yur F, Belge F, Bildik A, Çamaş H (1998). Norduz koyun ve keçilerinde hemoglobin tipleri, serum protein fraksiyonları ve lipoprotein seviyelerinin belirlenmesi, Y. Y. Ü. Vet. Fak. Derg., 9, 1-2, 29-31.

Zanotti-Casatti M, Rizzi R, Pagnacco G, Luzi F and Rognoni (1990). Marker genes and their association with production and reproduction in "Delle Langhe" sheep. J. Anim. Breed. Genet., 107, 96-103.

Zubay G (1983). Biochemistry, 4th Ed., Addison-Wesley Publishing Company, Massachusetts.

ÖZGEÇMİŞ

1978’de Malatya’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini burada tamamladıktan sonra liseyi Konya Atatürk Sağlık Meslek Lisesi’nde tamamladı. 1999 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulu’nu kazandı ve 2004 yılında mezun oldu. 2005 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı. Halen aynı anabilim dalında Yüksek Lisans eğitimine devam etmektedir.