

**NEZİHA ÇAKMAK**

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.**

**DOKTORA TEZİ**

**İSTANBUL-2016**



**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**KOCAELİ, SAKARYA VE BALIKESİR İLLERİNDE  
HOLŞTAYN İRKi SİĞİRLARDA BLAD, FXİD VE CVM  
HASTALIKLARI GENLERİNİN GENOTİP VE ALLEL  
FREKANSLARININ TESPİT EDİLMESİ**

**NEZİHA ÇAKMAK**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. HASRET YARDİBİ**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
BİYOKİMYA PROGRAMI**

**İSTANBUL-2016**




## DOKTORA TEZİ ONAYI

Istanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Fakültesi, Temel Bilimler Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programında Doktora öğrencisi Neziha ÇAKMAK tarafından Hasret YARDİBİ'nin danışmanlığında hazırlanan "Kocaeli, Sakarya ve Balıkesir İllerinde Holştayn Irkı Sığırlarda BLAD, FXID ve CVM Hastalıkları Genlerinin Genotip ve Allel Frekanslarının Tespit Edilmesi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 17/06/2016 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Başkanı

Ünvanı Adı Soyadı  
Üniversite, Fakülte  
Anabilim Dalı

Prof.Dr. Kemal Özdem ÖZTABAK  
İ.Ü Veteriner Fakültesi Biyokimya ABD



### Jüri-Danışman

Ünvanı Adı Soyadı  
Üniversite, Fakülte  
Anabilim Dalı

Prof.Dr. Hasret YARDİBİ  
İ.Ü. Veteriner Fakültesi Biyokimya ABD



### Jüri

Ünvanı Adı Soyadı  
Üniversite, Fakülte  
Anabilim Dalı

Doç.Dr. Serkan İKİZ

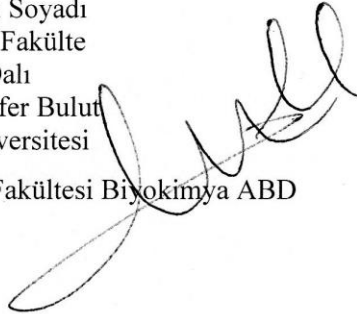
İ.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD



### Jüri

Ünvanı Adı Soyadı  
Üniversite, Fakülte  
Anabilim Dalı

Prof.Dr. Zafer Bulut  
Selçuk Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi Biyokimya ABD

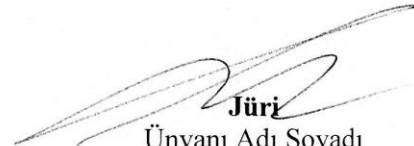


### Jüri

Ünvanı Adı Soyadı  
Üniversite, Fakülte  
Anabilim Dalı

Prof.Dr. Sena ÇENESİZ  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Veteriner Fakültesi Biyokimya ABD



**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumları kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



Neziha ÇAKMAK

## İTHAF

HACIHASANOĞLU VE ÇAKMAK ailelerine ithaf ediyorum

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimi ve tez çalışmam süresince bilimsel destekleri ile yardımlarını esirgemeyen danışmanım Sayın Prof.Dr. Hasret YARDİBİ' ye,

Tez çalışmamda emeği geçen Tez İzleme Komitesi üyeleri Sayın Prof.Dr. Kemal ÖZDEM ÖZTABAK ve Doç.Dr. Serkan İKİZ'e

Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri'nden Prof.Dr. Ayşen ALTINER'e, Prof.Dr. Gülhan Türkay HOŞTÜRK'e, Doç.Dr. İraz Akış AKAD'a, Doç.Dr. Atila ATEŞ'e ve Doç.Dr. Feraye Esen GÜRSEL'e,

Tez çalışmam için gerekli materyalin sağlanmasında yardımlarını esirgemeyen babam Ömer HACIHASANOĞLU ve abim Mehmet OK'a,

Ayrıca tez çalışmam süresince tüm desteklerinden dolayı HACIHASANOĞLU ve ÇAKMAK ailelerine, yardımlarından dolayı eşim Niyazi ÇAKMAK'a ve kızım Ayça Deniz ÇAKMAK'a teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 38954

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	İ
BEYAN.....	İİ
İTHAF.....	İİİ
TEŞEKKÜR.....	İV
İÇİNDEKİLER .....	V
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	X
ÖZET .....	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	3
2.2. Restriksiyon Parçacık Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP).....	5
2.3. Kılcal Elektroforezin Çalışma Prensibi.....	5
2.4. Kalıtsal Bozuklukların Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler.....	7
2.5. Sığır Yetiştiriciliğini Tehdit Eden Kalıtsal Hastalıklar.....	10
2.5.1. Sığır Lökosit Bağlanma Yetmezliği (BLAD) .....	12
2.5.2. Faktör XI Eksikliği (FXID) .....	14
2.5.3. Kompleks Vertebral Malformasyon (CVM) .....	15
2.6. Holştayn Sığırırkı .....	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
3.1. GEREÇ.....	18
3.1.1. Hayvan Örnekleri.....	18
3.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	18
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	19
3.1.4. Genomik DNA Elde Edilmesinde Kullanılan Çözelti ve Tamponlar.....	20
3.1.4.1. Lizis Tamponu.....	20
3.1.4.2. Nükleaz Tamponu.....	20
3.1.4.3. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi (% 10).....	20
3.1.4.4. Amonyum Asetat Çözeltisi (4.5 M).....	20

3.1.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Çözeltiler.....	21
3.1.5.1. Primer Solüsyonunun Hazırlanması.....	21
3.1.5.2. dNTP Solüsyonunun Hazırlanması.....	21
3.2. YÖNTEM.....	21
3.2.1. Kan Alma İşlemi.....	21
3.2.2. DNA İzolasyonu.....	21
3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	30
3.2.4. Agaroz Jelin Hazırlanması ve PZR Ürünlerinin Yürütülmesi.....	31
3.2.5. Restriksiyon Enziminin Kesim Bölgesi.....	32
3.2.6. PZR Ürünlerinin Kesimi.....	32
3.2.7. Dizin Analizi.....	33
3.2.8. İstatistiksel Analiz.....	33
3.2.9. Etik Kurul Onay Bilgileri.....	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. Sığır Lökosit Bağlanma Yetmezliği (BLAD).....	34
4.2. Faktör XI Eksikliği (FXID).....	37
4.3. Kompleks Vertebral Malformasyon (CVM).....	38
5. TARTIŞMA.....	39
KAYNAKLAR.....	45
ETİK KURUL KARARI.....	58
ÖZGEÇMİŞ.....	59

**TABLULAR LİSTESİ**

Tablo 3.2.3.1: Hedef bölgenin çoğaltılması için kullanılan PZR karışımındaki solüsyonlar ve miktarları.....	31
Tablo 4.1: Holştayn ırkı sığırlarda CD18 geni polimorfizminin genotip ve allel frekansları.....	36



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Kılcal elektroforez tekniği kullanılarak analizi gerçekleştirilmiş bir DNA örneğinin nükleotid kromotogramı.....	6
Şekil 2.6.1: Holştayn ırkı inek.....	17
Şekil 2.6.2: Holştayn ırkı boğa.....	17
Şekil 3.2.2.1: Alınan kanların karıştırılması.....	22
Şekil 3.2.2.2: Kanların santrifüj tüpüne alınması.....	22
Şekil 3.2.2.3: Lyzis buffer eklenmesi ve vorteksleme.....	23
Şekil 3.2.2.4: Buzdolabında bekletme.....	23
Şekil 3.2.2.5: Santrifügasyon.....	24
Şekil 3.2.2.6: Üst sıvının dökülmesi.....	24
Şekil 3.2.2.7: Lyzis buffer ekleme ve vorteksleme.....	25
Şekil 3.2.2.8: Pelletin üst sıvıdan ayrılmamış hali .....	25
Şekil 3.2.2.9: Pellete zarar vermeden üst sıvının ayrılması.....	26
Şekil 3.2.2.10: Pellet üzerine eklenen çözeltiler.....	26
Şekil 3.2.2.11: İnkübasyon.....	27
Şekil 3.2.2.12: Amonyum asetat eklenmesi ve vorteksleme.....	27
Şekil 3.2.2.13: Tüpün içeriğini başka bir falkona boşaltma.....	28
Şekil 3.2.2.14: Mutlak etanol ile muamele.....	28
Şekil 3.2.2.15: DNA iplikçığı.....	29
Şekil 4.1.1: CD18 geninin 383. nükleotidindeki hedef bölgenin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.....	34
Şekil 4.1.2: Homozigot ve heterozigot bireylerin nükleotid kromotogramı.....	35
Şekil 4.2.1: Faktör XI geni 12. ekzon 244 bç'lik hedef bölgesinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.....	37

Şekil 4.3.1: SLC35A3 geni 4. ekzon 233 bç'lik hedef bölgesinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.....38



**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

ABD	:	Amerika Birleşik Devletleri
APTT	:	Aktive parsiyel tromboplastin zamanı ölçümü
BÇ	:	Baz çifti
BLAD	:	Sığır lökosit bağlanma yetmezliği
$\beta 2$	:	Beta iki integrin proteini
CVM	:	Kompleks vertebral malformasyon
dATP	:	Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	:	Deoksisitidin trifosfat
dGTP	:	Deoksiguanozin trifosfat
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
dTTP	:	Deoksitimidin trifosfat
dNTP	:	Deoksiribonükleotid trifosfat
DUMPS	:	Üridin monofosfat sentetaz eksikliği
EDTA	:	Etilen diamin tetra asetik asit
F	:	Forward
FXID	:	Faktor XI eksikliği
g	:	Gram
HPLC	:	Yüksek performans sıvı kromatografisi
HZD	:	Kalıtsal çinko eksikliği hastalığı
$\text{KHCO}_3$	:	Potasyum bikarbonat
$\text{MgCl}_2$	:	Magnezyum klorür
ml	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
MSUD	:	Akçağaç şurubu idrar hastalığı

NaCl	:	Sodyum klorür
NADH	:	Nikotinamid adenin dinükleotid
NCLs	:	Sinirsel keroid lipofusinoz (Batten hastalığı)
NH <sub>4</sub> Cl	:	Amonyum klorür
nm	:	Nanometre
nmol	:	Nanomol
pmol	:	Pikomol
PZR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
R	:	Reverse
rpm	:	Devir/dakika
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
SMA	:	Spinal muscular atrofi
SLC35A3	:	Taşıyıcı protein
TEB	:	Tris borik asit etidyum bromür
UV	:	Ultraviole
U	:	Ünite
°C	:	Celsius
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
µM	:	Mikromolar
$\chi^2$	:	Ki-kare

## ÖZET

Çakmak, N. (2016). Kocaeli, Sakarya ve Balıkesir İllerinde Holştayn Irkı Sığırlarda BLAD, FXID ve CVM Hastalıkları Genlerinin Genotip ve Allel Frekanslarının Tespit Edilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Kalıtsal hastalıklar; anne ve babadan yavruya aktarılan genetik materyalde oluşan deformasyonları içeren ve ayrıca hayvan sağlığını, verimini olumsuz etkileyerek veya embriyonik ölüme sebep olarak fertilitiyi azaltan hastalıklar olarak tanımlanabilir. Bu tür hastalıklar, mutasyonlar sonucu genetik kodları değiştirerek bozuk protein sentezi ya da protein sentezinin durmasına neden olmaktadır. Çiftlik hayvanlarında ciddi anlamda verim ve ekonomik kayıplara neden olan kalıtsal hastalıkların moleküler düzeyde işleyişlerini bilmek, hastalıkları sürüden uzaklaştırmada büyük önem taşır. Araştırmamızda, genetik çalışmaları ile ilgili yeterli bilgiler bulunmaması sebebiyle Holştayn ırkı sığırların genetik hastalıklarından Sığır Lökosit Bağlanma Yetmezliği (BLAD), Faktör XI Eksikliği (FXID) ve Kompleks Vertebral Malformasyon (CVM) hastalıklarının, bu hastalıklara sebep olan genlerin allel frekanslarının tespit edilmesi amaçlanmıştır. 300 adet Holştayn sığır ırkından kan alınarak standart amonyum asetat çöktürme yöntemiyle DNA örnekleri izole edilmiştir. BLAD'ne, FXID'ne ve CVM'a sebep olan mutant allelleri belirlemek için hedef bölgeler polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmıştır. BLAD için dizin (sekans) analizi işlemine tabi tutulan örneklerin nükleotid kromotogramlarına göre toplamda 300 adet sığırdan 4 tanesi heterozigot birey, 296 tanesinin homozigot birey olduğu tespit edilmiştir. FXID hastalığı için PZR işlemi yeterli olup, CVM hastalığı için ise PZR ile çoğaltılan örnekler restriksiyon parçacık uzunluğu polimorfizmi (RFLP) işlemine tabi tutulmuştur. FXID ve CVM hastalıklarının elde edilen sonuçlarına göre 300 adet bireyin hepsi homozigot normal olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler : BLAD, FXID, CVM, Dizin analizi, PZR-RFLP

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 38954

## ABSTRACT

Çakmak, N. (2016). Detection of Allele Frequency and Genotype of BLAD, FXID and CVM disease gene in Holstein Cattle in Kocaeli, Sakarya and Balıkesir Provinces. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Biochemistry, PhD, Thesis. İstanbul, Turkey.

Hereditary diseases contain from mother and father offspring with deformations occurring in the genetic materials. Animal health and productivity can negatively affect fertility or to cause embryonic death. For this reason such diseases of mutations cause the stop protein synthesis or protein synthesis by replacing defective genetic codes. Knowledge of hereditary diseases cause livestock productivity and economically decreasing in serious is great importance in the removal from the herd. In our research, three major genetic diseases were investigated all over the world widely held Holstein cattle's. The aim of the study is to develop a scientific base for selection by determining genotype and allele distributions of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD), Factor XI Deficiency (FXID) and Complex Vertebral Malformation (CVM) polymorphism. Blood samples were taken from 300 Holstein cattle breeds. DNA samples were isolated by using the standard ammonium acetate salt-out method. Target regions were amplified by using polymerase chain reaction. Sequence analysis of the samples subjected to the process according to the nucleotide chromatograms for BLAD 4 were heterozygous individuals from bovine total of 300 and 296 of them were found to be homozygous. PCR process for FXID disease is sufficient and for the while CVM disease is samples amplified by particles restriction length polymorphism (RFLP) were subjected to the process. Based on the results obtained FXID and CVM 300 subjects were homozygous normal.

**Key Words:** BLAD, FXID, CVM, Sequence analysis, PZR-RFLP

This study was supported by the Science research Projects Department of İstanbul University. Project No: 38954.

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünyada süt endüstrisi için yararlanılan ineklerin yaklaşık %70'inin suni tohumlama yöntemi ile tohumlandığı belirtilmektedir (Citek ve ark., 2006). Suni tohumlama yönteminin, süt endüstrisinde sıkça kullanılan Holştayn ırkının, süt verimini bir laktasyonda 900 litre arttırdığı tespit edilmiştir (Mukhopadhyaya ve ark., 2006). Suni tohumlama yönteminin hayvan başına verimi artırırken, aynı zamanda yetiştiriciliği yapılan ırklarda ırk içi genetik benzerliğin de artmasına neden olduğu ifade edilmektedir (Thomsen ve ark., 2006). Irk içinde artan genetik benzerliğin bireylerin yaşama gücünü ve döl verimini düşüren kalıtsal hastalıkların hızla popülasyon içinde yayılmasına sebep olduğu belirtilmektedir (Akyüz ve ark., 2008; Mukhopadhyaya ve ark., 2006). Bu kalıtsal hastalıkların çok kısa sürede ülkeler hatta kıtalar aşarak tüm dünyaya yayılma eğilimi gösterdiği bildirilmiştir (Mukhopadhyaya ve ark., 2006).

Süt sığırı yetiştiriciliğinde birkaç seçkin boğanın yaygın kullanımı mutant ve resesif iki allelin, yavruların genotiplerinde bir araya gelme şansını arttırdığı ifade edilmektedir (Mukhopadhyaya ve ark., 2006). Bu sebepten dolayı, kalıtsal hastalıklara sebep olan mutant allellerin popülasyondan temizlenebilmesi ancak taşıyıcı bireylerin belirlenerek sürüden uzaklaştırılmasıyla sağlanabileceği vurgulanmaktadır. Ekonomik açıdan bir sürünün tüm bireylerinin kalıtsal hastalıklar yönünden taranması zordur. Ancak suni tohumlama ve embriyo nakli amacıyla kullanılan damızlık adaylarının, ırka özgü kalıtsal hastalıkları taşıyıp taşımadıklarının kesin olarak belirlenmesi kalıtsal hastalıkların kontrol altına alınmasına yardımcı olabileceği belirtilmektedir (Ackermann ve ark., 1993).

Veteriner hekimlikte, kalıtsal bir hastalığa neden olan genin moleküler düzeyde belirlenmesinin, kalıtsal hastalık yönünden ari sürülere sahip olmak için önemli olduğu ve hastalığın sürüden uzaklaştırılmasının bu aşamada büyük önem taşıdığı belirtilmiştir (Citek ve ark., 2006). Sığırlarda görülen kalıtsal hastalıkların çoğu otozomal resesif kalıtım şekli göstermektedir. Bu nedenle otozomal resesif kalıtım şekli gösteren genlerin belirlenmeden popülasyona yayılma ihtimalinin olduğu belirtilmiştir (Akyüz ve Ertuğrul, 2008).

Taşıyıcıların fenotipik olarak belirlenmesi pek mümkün değildir. Bireyde dominant kalıtım yoluyla etkisini gösteren veya X kromozomuna bağlı kalıtım yolu izleyen genlerin sığır yetiştiriciliğinde daha önemli olduğu ifade edilmektedir (Meydan ve ark., 2010). Son elli yılda yaygın yetiştiriciliği yapılan sığır ırklarında 300 civarında kalıtsal hastalığın tespit edildiği belirtilmektedir (Agerholm ve ark., 2001).

Türkiye’de kullanılan damızlık ve damızlık adayı kültür ırkı sığırların kalıtsal bozukluklar yönünden genetik yapılarının incelenmesi gerekmektedir. Yerli gen kaynaklarının yetersizliğinden dolayı, ırka özgü olduğu düşünülen birçok kalıtsal hastalığın genetik yapıları tam aydınlatılmamıştır.

Araştırmamızda, tüm dünyada yetiştiriciliği yaygın olarak yapılan Holştayn ırkı sığırların genetik hastalıklarından 3 önemli hastalık incelenmiştir. Çalışmamızda Kocaeli, Sakarya ve Balıkesir illerindeki Holştayn ırkı sığırlarda Sığır Lökosit Bağlanma Yetmezliği (BLAD), Faktör XI Eksikliği (FXID) ve Kompleks Vertebral Malformasyon (CVM) hastalıklarının genetik çalışmaları daha önce yapılmadığından bu hastalıklara sebep olan genlerin allel frekanslarının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ilk kez 1983 yılında Dr. Kary Banks Mullis tarafından geliştirilmiş olup bu yöntem kendisine 1993 yılında nobel ödülünü kazandırmıştır (Mullis, 1983). Böylece canlılarda genom çalışmaları hız kazanmıştır. Metod elde edilmek istenen DNA kısımlarının çok miktarda çoğaltılması esasına dayanmaktadır (Arnheim ve Erlich, 1992).

Polimeraz zincir reaksiyonu DNA'nın iki zincirinin yüksek ısıyla birbirlerinden ayrılmasını (denatürasyon), oligonükleotidlerin ve primerlerin bağlanmasını daha sonra zincirin uzama işleminin gerçekleşmesini (polimerizasyon) kapsayan bir döngünün çok sayıda tekrarı ile oluşur (Klug ve Cummings, 2003; Temizkan ve Arda, 2004). Reaksiyon denatürasyon aşaması ile başlamaktadır. Bu başlangıç denatürasyonundaki ısı 92-95<sup>0</sup>C arasında olup süresi genellikle 2 ila 5 dakika arasındadır. Her döngüde denatürasyon aşaması uygulanır. Bu basamakta da ısı başlangıç denatürasyonundaki gibi 92-95<sup>0</sup>C arasında olmasına rağmen süresi en fazla 1 dakikadır. Her döngüde denatürasyon basamağının ardından primer ve oligonükleotidlerin bağlanma aşaması gelmektedir. Bu aşamada bağlanma ısısının tespit edilmesi oldukça önemlidir. Bunun belirlenmesinde en yaygın olarak kullanılan formül aşağıda verilmiştir (Temizkan ve Arda, 2004).

$$(Aadenin+Timin sayısı) \times 2^{\circ}C + (Guanin+Sitozin sayısı) \times 4^{\circ}C$$

Çoğunlukla bu formülle hesaplanan bağlanma ısısından 3-5 <sup>0</sup>C daha düşük bağlanma ısıları kullanılır. Bağlanma ısısının aşırı derecede düşük olması istenmeyen bağlanmaları arttırabildiği gibi hedef bölge dışındaki bölgelerin de çoğalmasına neden olabilmektedir. Doğru bağlanma ısısı spesifik ürünlerin elde edilmesini kolaylaştırmaktadır. Primerler istenilen bölgeye bağlandıktan sonra primerlerin uzatılması aşaması başlamaktadır. Deoksiribonükleotid trifosfatların (dNTPs) bağlanma reaksiyonu için taq DNA polimeraz enzimi kullanılmaktadır. Polimerizasyon aşaması için ideal derece 72<sup>0</sup>C'dir. Genellikle her bir döngü içerisindeki 2 dakika, uzatma için

yeterli olmaktadır. Reaksiyonun gerçekleşmesini garanti altına almak amacıyla son döngüden sonra ayrıca 10 dakikalık bir uzatma uygulanır. Toplam döngü sayısı genellikle 25-35 arasındadır. Döngü sayısının artırılması, istenen ürün miktarını değiştirmez fakat istenmeyen ürün miktarında bir artışa neden olabilmektedir. Bu nedenle genellikle döngü sayısı 40 döngünün üzerine çıkarılmamaktadır. Tüm bu işlemler ısı döngüsü (thermal cycles) cihazında gerçekleştirilmektedir. Isı döngüsü cihazında istenilen bir genomik DNA bölgesinin çoğaltılmasında kullanılabilecek örnek bir PZR reaksiyonu aşağıda verilmiştir (Erlich 1989; Klug ve Cummings, 2003; Temizkan ve Arda, 2004).

94°C	5 dakika	başlangıç denatürasyonu	
<b>94°C</b>	<b>1 dakika</b>	<b>denatürasyon</b>	
<b>56°C</b>	<b>1 dakika</b>	<b>bağlanma</b>	<b>35 siklus</b>
<b>72°C</b>	<b>1 dakika</b>	<b>uzama</b>	
72°C	10 dakika	son uzama	

Bir PZR'nun gerçekleştirilebilmesi için ortamda bu reaksiyonun temel bileşenlerinin olması gerekmektedir. Bunlardan ilki kalıp DNA'dır. Bu DNA memeliler için genellikle genomik DNA'dır. Fakat bunun dışında memeliler için mitokondrial DNA olabileceği gibi bakteriler için plazmid veya faj DNA da olabilmektedir. İkinci PZR bileşeni DNA polimerazlardır. DNA polimeraz enzimleri, kalıp ipliğe tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orjinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak 4 çeşit deoksiribonükleotid trifosfattan uzun polinükleotid zincirin sentezini katalize etmektedir. Bir başka PZR bileşeni primerlerdir. İstenilen DNA bölgesinin çoğaltılmasında kalıp DNA'ya bağlanabilecek primerlere gerek vardır. Bu primerler 20-30 nükleotitten oluşmaktadır ve ticari olarak sentez edilirler. Bir diğer PZR bileşeni deoksiribonükleotid trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP ve dCTP)'dir. Bunlar ya tek tek ya da bir karışım halinde ticari olarak satılmaktadır. Son PZR bileşenleri ise tamponlar ve MgCl<sub>2</sub>'dir (Temizkan ve Arda, 2004; White 1993).

PZR'de kullanılan bu tamponlar DNA polimeraz enziminin aktivitesini sağlamak için gereklidirler.  $Mg^{+2}$  iyonları ise deoksiribonükleozid trifosfatlar ile çözünebilir kompleksler oluşturarak polimeraz aktivitesini arttırlar. Tüm bu bileşenler kullanılarak bir PZR karışımı hazırlanır ve ısı döngüsü cihazına yerleştirilerek hedef DNA bölgesinden çok sayıda kopya elde edilmesi sağlanır (Temizkan ve Arda, 2004; White 1993).

## **2.2. Restriksiyon Parçacık Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP)**

Restriksiyon parçacık uzunluğu polimorfizmi (restriction fragment length polymorphism-RFLP), DNA'nın restriksiyon endonükleaz adı verilen enzimlerle kesilmesi işlemidir. Bakterilerden elde edilen restriksiyon enzimleri, çift iplikli DNA'daki özel bölgeleri tanıyarak kesim yapan ve DNA'daki iki iplikçiği de sindirerek bir bölgenin ya da bir bölgedeki DNA parçasının çıkartılmasında görev yapan enzimlerdir (Botstein ve ark., 1980).

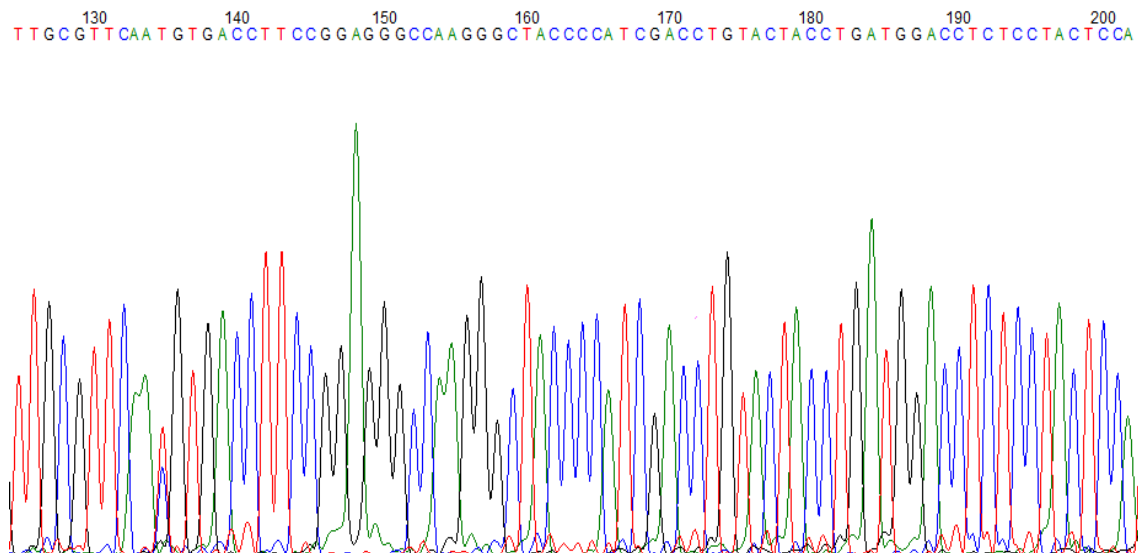
DNA'nın bu enzimlerden bir veya birkaçı ile kesilmesinden sonra ortaya çıkan parçacıklar agaroz jel elektroforezine tabi tutularak etidyum bromür ile UV ışık altında görünür hale getirilmektedir. Ortaya çıkan DNA parçacıklarının sayısı ve boyutlarının kıyaslanmasıyla elde edilen çeşitliliğe Restriksiyon Parçacık Uzunluğu Polimorfizmi denir. DNA'daki bir bölgenin kesim sonuçlarının bireyler arasında farklılık göstermesi, o enzime spesifik baz diziliminde bir değişiklik olduğunu ortaya koymaktadır. Bu değişiklik kesim bölgesinin ortadan kalkması ya da başka bir diziye dönüşmesi ile ortaya çıkabilmektedir. Bir bölgedeki DNA diziliminde görülen insersiyon (eklenme) ve delesyonlar (eksilme) da farklılıklara yol açabilmektedir. Genetik çalışmalarda RFLP'ler ilk olarak 1974 yılında adenovirüslerdeki mutasyonları tespit etmek amacıyla kullanılmıştır (Botstein ve ark., 1980).

## **2.3. Kılcal Elektroforezin Çalışma Prensipleri**

Elektroforez yüklü moleküllerin bir elektrik ortamında elektrik yükleri ve molekül ağırlıklarına bağlı olarak farklı hızlarda göç etmelerine dayanan bir yöntemdir. Bu yöntemde analizi yapılacak örnekler bir destek ortamında uygulanmaktadır. Bu destek ortamına bağlı olarak analizi yapılacak moleküller değişmektedir (Temizkan ve Arda, 2004).

Örneğin destek ortamı selüloz olan elektroforezlerde amino asit ve karbonhidratlar gibi düşük molekül ağırlıklı moleküller analiz edilebilirken agaroz ya da poliakrilamid jeller ile daha yüksek molekül ağırlıklı nükleik asitler ve proteinler analiz edilebilmektedir. Modern elektroforetik tekniklerde jel kullanımı tercih edilmektedir (Temizkan ve Arda, 2004).

Kılcal elektroforez; yüksek ayırıştırma gücü ile yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC)'nin otomasyon özelliğinin karışımından oluşmuş bir tekniktir. Bu yöntem ile çok sayıda örneğin yüksek bir hassasiyette analizi yapılabilmektedir. Bu teknikte giriş ve çıkış tampon tanklarının içerisinde yine tamponla doldurulmuş kılcal tüpler, güç kaynağı ve sürekli çalışan bir algılayıcı bulunmaktadır. Analizi yapılacak örnekler öncelikle kılcal tüplere uygulanır. Güç kaynağına bağlanmış olan platin elektrotlar ile kılcal tüplerin de buldukları tanklara yüksek voltaj verilir. Daha sonra moleküller elektrik akımının etkisiyle hareket ederler ve tüpün diğer ucundan çıkan moleküller ultraviyole dalga boyunda çalışan bir algılayıcı ile saptanır. Bu yöntem DNA dizin analizinin temelini oluşturmaktadır. Dizin analizi cihazlarının tamamı temel olarak bu yöntemle çalışır. Dizin analizinde kılcal borular poliakrilamid ya da SDS-poliakrilamid ile doludur. Algılayıcıdan bilgisayara giden sonuçlar her bir nükleotid için ayrı bir renkte olan pikler ile ifade edilir ve buna nükleotid kromatogramı adı verilir (Temizkan ve Arda, 2004).



**Şekil 2.1. Kılcal elektroforez tekniği kullanılarak analizi gerçekleştirilmiş bir DNA örneğinin nükleotid kromatogramı**

## 2.4. Kalıtsal Bozuklukların Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Verimli erkek damızlıklarda suni tohumlama yöntemiyle çok sayıda yavru elde edilebilmektedir. Bu sebeple damızlık adaylarının verimini negatif yönde etkileyecek kalıtsal bozuklukların belirlenmesi gerekmektedir (Muraleedharan ve ark., 1999). Kalıtsal defektlere neden olan genler genellikle çekinik otozomal kalıtım şekli göstermektedirler. Fenotipik olarak bir bozukluk göstermezler. Popülasyonda varlıklarını sürdürmeye devam ederler. Dolayısıyla bu zararlı genleri yavrularına da aktarabilirler. Hastalık yapıcı bu genleri taşıyan heterozigot bireyler sürüden uzaklaştırılmalıdır (Alpan ve ark., 1990). Kalıtsal bozuklukların belirlenmesinde kullanılan yöntemler 4 ana başlık altında incelenebilir (Akyüz ve Ertuğrul, 2006b).

**1. Pedigri analizi;** yöntem bir hayvanın kalıtsal bozukluğa neden olan resesif alleli taşıyıp taşımadığının belirlenmesine yardımcı olabilmektedir. Bu analiz, pedigri bilgileri bulunan ve kullanılabilir durumdaki sürülerde uygulanabilmektedir. Hasta buzağların geriye doğru beş jenerasyon akrabaları incelenir (Kaneko ve ark., 1997; Kehrlı ve ark., 1992). Hastalığı taşıdığı tespit edilmiş boğalarla akrabalıkları olan boğa ve ineklerin de taşıyıcı olma ihtimali yüksektir (Akyüz ve Ertuğrul, 2006b). Fakat, yakın akraba birleştirmeleri yapıldığında ayrıca birleştirilen ailelerin çok olduğu durumlarda bu bilgileri yorumlamak oldukça zor olmaktadır (Akyüz ve Ertuğrul, 2006b).

**2. Test birleştirmeleri:** özellikle süt sığırcılığında kullanılmakta ve 3 farklı şekilde yapılmaktadır.

I- Çekinik homozigot bireylerle birleştirme

II- Heterozigot dişilerle birleştirme

III- Olası ebeveyni yavrularıyla birleştirme

Test birleştirmeleri yönteminin dezavantajları vardır. Uzun zaman gerektirir. Bir boğanın yaklaşık 2 yaşında ilk kez damızlıkta kullanıldığı düşünüldüğünde ve ayrıca sığırlarda gebeliğin  $282 \pm 10$  gün sürdüğü varsayılırsa yöntemin ne kadar uzun bir zaman alacağı daha iyi anlaşılmaktadır.

İkincisi masraflıdır, test aşamasında boğanın bakımı, beslenmesi ile alınan spermaların saklanması gerekmektedir (Nicholas, 1996).

Deneme sonunda boğanın heterozigot olduğu tespit edilirse yapılan masraflar boşa gitmiş sayılabilir. Test birleştirmeleri sonunda damızlık boğanın homozigot olduğu asla ispat edilememektedir, düşük seviyede de olsa tespit edilememiş taşıyıcı olma olasılığı daima mümkündür (Nicholas, 1996).

**3. Biyokimyasal tanı;** biyokimyasal olarak bir kalıtsal hasarın belirlenebilmesi için, hasarın bir protein eksikliğine neden olması ve bu eksikliğin de, kan ve diğer dokulardan uygun bir laboratuvar testi ile belirlenebilmesi gerekmektedir. Bu yöntemle sadece sağlıklı ve hasta bireyler belirlenebilir. Taşıyıcıların belirlenmesi için başka yöntemler kullanılmalıdır (Akyüz ve Ertuğrul, 2006b; Nicholas, 1996). Sığır lökosit bağlanma yetmezliği (BLAD) tanısı biyokimyasal olarak CD18 glikoproteini bulunduran lökositleri sayan ve bunları yoğunluk olarak gösteren 'Flow Sitometri' cihazı ile yapılabilir (Tammen ve ark., 1996). Faktör XI eksikliği (FXID) hastalığının tanısında, bireylerdeki FXID etkinliğini izlemek için aktive parsiyel tromboplastin zamanını (APTT) ölçümü kullanılabilir (Ghanem ve ark., 2005). Ancak bu yöntem, homozigot bireylerin belirlenmesi için olumlu sonuç vermesine karşın heterozigot bireylerin belirlenmesinde olumlu sonuç vermemektedir (Ghanem ve ark., 2005). Bu nedenle FXID taşıyıcılarının kesin olarak tespiti için en etkili yöntem uygun primerlerin kullanılmasıyla yapılan PZR yöntemidir (Marron ve ark., 2004). Kompleks vertebral malformasyon (CVM) hastalığının belirlenmesi için herhangi bir biyokimyasal test bulunmamaktadır.

**4. Moleküler tanı;** kalıtsal bozukluğun genetik temelini aydınlatılmasından sonra geliştirilen ve DNA kullanılarak yapılan testler; hasta, normal ve taşıyıcılar hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlamaktadırlar. Moleküler tanı teknikleri, kalıtsal hastalıktan sorumlu genin kendisinin veya yerinin belirlenmesi esasına dayalı testlerdir (Wood ve Langlois, 1991). Genomik DNA, RNA, mitokondriyal DNA ve protein kullanılarak yapılan moleküler tanıda iki genel tanı tekniği vardır. Birincisi genetik bozukluğun doğrudan tanısı, ikincisi ise bozuk genin içine veya sonuna eklenen DNA işaret genlerinin kullanılmasıyla yapılan dolaylı testlerdir (Dawson, 1990). Kalıtsal bozukluk çoğu durumda önceden tanımlanmış bir hastalık olabilir. Bununla birlikte moleküler yöntemler, temeli henüz açıklanmamış olan bozuklukların da aydınlanmasına yardımcı olabilmektedir (Akyüz ve Ertuğrul, 2006b).

Moleküler tanı yöntemleri daha doğru, daha ucuz ve daha hızlı sonuç vermeleri nedeniyle en yaygın kullanılan testlerdir. Moleküler tanı ile sadece canlı bireyler değil sperma da incelenebilir (Akyüz ve Ertuğrul, 2006b).

**I-** Bozukluğa neden olan genlerin doğrudan tanımlanması: bu testler çok güçlü ve yüksek duyarlılığa sahiptir (Wood ve Langlois, 1991).

**A- Restriksiyon enzim analizleri:** Restriksiyon enzimleri, genomik DNA'yı kendileri için özel olan bölgelerden keserek farklı büyüklükte DNA parçacıkları oluşturmaktadırlar. Tür içindeki bireylerin DNA'ları aynı restriksiyon enzimler ile kesildiğinde aynı büyüklükte parçacıkları oluşturmaktadırlar. (Wood ve Langlois, 1991). Enzimin tanıdığı bölge mutasyon ile değişirse, enzim DNA'yı bu bölgeden kesemez ve beklenenden farklı büyüklükte parçacıklar elde edilir (Akyüz, 2004; Boehm, 1989; Dawson, 1990; Wood ve Langlois, 1991). Elde edilen bu parçacıklar, bir membrana transfer edilerek yapılan southern blot tekniği veya parçacıkları büyüklüklerine göre ayırım için RFLP yöntemi homozigot +/+, heterozigot +/- ve homozigot -/- bireylerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. BLAD (Akyüz, 2004; Boehm, 1989; Tammen ve ark., 1996), Üridin Monofosfat Sentetaz noksanlığı (DUMPS) (Schwenger ve ark., 1993), Sitrülin birikimi (Healy ve ark., 1995), kedi ve köpeklerde Seroid Lipofuskinosis (Jolly ve ark., 1997), köpeklerde görülen displazi (Wang ve ark., 1999), hemofili A (Clark ve ark., 1997), doberman köpeklerinde görülen Von Willebrand Hastalığı (Holmes ve ark., 1996), bakır zehirlenmesi sonucu Bedlington Terier köpek ırkında kalıtsal olarak karaciğer hücrelerinde azalma ile sonuçlanan kalıtsal bozukluk (Rotfuizen ve ark., 1999), RFLP ile belirlenebilmektedir.

**B- Allel spesifik oligonükleotidler (ASO):** Eğer değişen baz ve mutasyon bölgesini çevreleyen nükleotid sırası biliniyorsa kalıtsal bozukluk ASO hibridizasyon problemleri kullanılarak saptanabilmektedir (Arda, 1995). Restriksiyon enzimlerinin tanıma bölgelerini değiştirmeyen baz değişimleri, 1 ila 4 baz çifti uzunluğundaki kopmalar veya eklemeler, özel ASO ile belirlenebilir (Wood ve Langlois, 1991). Bu yöntem ilk olarak insanlardaki Alfa Talesemi'nin tanısında kullanılmıştır (Shin ve ark., 1997).

At yetiştiriciliğinde, Arap taylarında şiddetli kombine immun yetmezlik hastalığının (severe combined immunodeficiency, SCID) tanısında PZR ile elde edilen ürünler SCID'li ve normal hayvanlar için hazırlanan problemlerle hibridize edilerek yapılmaktadır (Shin ve ark., 1997).

**II-** Bozukluğa neden olan genin dolaylı tanısı: kalıtsal bozuklukların büyük çoğunluğunda bu hastalığa sebep olan gen bilinmediği için dolaylı tanı teknikleri kullanılmaktadır (Wood ve Langlois, 1991).

**İlişki analizi:** İlişki analizi ilk olarak orak hücreli anemi tanısında kullanılmıştır (Boehm, 1989). Kromozom boyunca dağılmış kısa baz çifti tekrar bölgeleri, mikrosatellit veya işaret genler olarak adlandırılır. Nükleotid sırası değişmiş bir genin yanında bulunan işaret geni, bozuk genle birlikte nesiller boyunca aynı kalıtım yolunu izlemektedir Bu nedenle işaret genin belirlenmesi, bozuk genin tespitiyle aynı anlama gelir (Arda, 1995; Dawson, 1990). İlişki analizi, hastalık geninin işaret genine yakın olduğu ve krossingover'de hastalık geni ile işaret geninin ayrılmayacağı esasına dayanmaktadır. DNA işaretleyicilerinin kullanımı iki aşamada yapılır; önce işaretleyici gen belirlenir, sonra incelenen ailenin en az iki jenerasyon boyunca tüm bireylerinden DNA alınarak, kalıtsal hastalığa neden olan lokusa sahip bireyler belirlenmektedir (Nicholas, 1996).

## **2.5. Sığır Yetiştiriciliğini Tehdit Eden Kalıtsal Hastalıklar**

Genetik, kalıtım ve değişimle ilgilenen bilim dalı olarak ifade edilmektedir. Bir nesilden diğerine aktarılan, protein sentezi için kodlanmış bilgilere sahip kalıtsal birimler gen olarak tanımlanmaktadır (Başaran, 1996). Kalıtsal hastalıklar ise anne ve babadan yavruya aktarılan genetik metaryelde oluşan deformasyonları içermektedir. Bu hastalıklar hayvanın sağlığını ve verimini olumsuz etkileyebilmektedir (Citek ve ark., 2006). Genetik hastalıklar, aktarılan genlerde kendiliğinden ya da çevresel etkiler nedeniyle oluşabilmektedir. Bu etkiler genetik kodları değiştirerek bozuk protein sentezi ya da protein sentezinin durmasına neden olabilmektedir (Başaran, 1996).

Kalıtsal hastalıklar, çiftlik hayvanlarında ciddi anlamda verim ve ekonomik kayıplara neden olabilir. Bu nedenle kalıtsal hastalıkların moleküler düzeyde işleyişlerini bilmek, hastalıkları sürüden uzaklaştırmada büyük önem taşımaktadır (Citek ve ark., 2006). Yetiştirme programları hazırlanırken damızlık adaylarının o ırkta en sık görülen kalıtsal hastalıklar yönünden genetik yapılarının belirlenmesi gerekmektedir. Genetik yapıların belirlenmemesi durumunda kalıtsal hastalığa sebep olan mutant allel sürüde varlığını sürdürerek hasta yavruların doğmasına neden olabilmektedir (Akyüz ve Ertuğrul, 2006a). Aşağıda tespit edilmiş 20 genetik hastalığın isimleri yer almaktadır.

- 1-Sığır Lökosit Bağlanma Yetmezliği (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency, BLAD)
- 2- Üridin Monofosfat Sentetaz Eksikliği (Deficiency of Uridine Monophosphate Synthase, DUMPS)
- 3- Kompleks Vertebral Malformasyon (Complex Vertebral Malformation, CVM)
- 4- Sitrülin Birikimi (Citrullinaemia)
- 5- Faktör XI Eksikliği (FXID)
- 6- Glikojen Depo Hastalığı (Miyofosforilaz Eksikliği, Tip V)
- 7- Kalıtsal Çinko Eksikliği Hastalığı (Hereditary Zinc Deficiency, HZD, A46)
- 8- Sığır Claudin-16 (CL-16) Eksikliği Sendromu
- 9- Batten Hastalığı (Sinirsel Keroid Lipofusinoz, NCLs)
- 10- Alfa Mannosidozis
- 11- Akçaağaç Şurubu İdrar Hastalığı (Maple Syrup Urine Disease, MSUD)
- 12- Kassel Hipertrofi (Muscular Hypertrophy)
- 13- Sferositozis
- 14- Şediak-Higaşi (Chediak-Higashi) Sendromu
- 15- Spinal Muscular Atrofi (SMA)
- 16- Doğuştan Tibia Yokluğu (Tibial Hemimelia)

17- Myoclonus

18- Sindaktili (Syndactyly)

19- Konjenital Eritropoetik Porfiriya (Congenital Erythropoietic Porphyria)

20- Kalıtsal Guatr

### 2.5.1. Sığır Lökosit Bağlanma Yetmezliği (BLAD)

Sığır lökosit bağlanma yetmezliği (bovine leukocyte adhesion deficiency, BLAD); Holştayn sığır ırkında tespit edilmiştir. Hasta buzağuların doğumundan itibaren ortaya çıkan ve buzağıda en geç bir yıl içerisinde tekrarlayan mukozal enfeksiyonlar nedeniyle ölmesine neden olmaktadır. BLAD, otozomal resesif kalıtım şekli gösteren kalıtsal bir hastalıktır (Ackermann ve ark., 1993; Batt ve ark., 1994; Sipes ve ark., 1999; Tammen ve ark., 1996).

$\beta 2$  integrin molekülünde oluşan bir bozukluk, lökositlerin damar dışına çıkamamaları lezyonlu dokuya ulaşmalarını engel olmaktadır (Ackermann ve ark., 1999; Fesus ve ark., 1999; Kaneko ve ark., 1997; Kehrlı ve ark., 1992b; Kishimoto ve ark., 1989; Sağlam ve ark., 1997; Schuster ve ark., 1992).

Sığır lökosit bağlanma yetmezliği hastalığı, endotel-lökosit bağlanmasını sağlayan CD11/CD18 kompleksinin alt ünitesi olan  $\beta 2$  integrin (CD18) glikoproteinini kodlayan genin 383 numaralı pozisyonundaki guanin nükleotidinin adenin nükleotidi ile yer değiştirmesine neden olan bir nokta mutasyonu sonucu oluşmaktadır. Bu değişiklik CD18 genindeki 128. amino asidi aspartik asitten glisine dönüşmesine neden olmaktadır (Craznik ve ark., 2007; Kehrlı ve ark., 1992b; Millar ve ark., 2000; Nagahata ve ark., 1994).

Hastalık ilk kez Amerika'da 1990 yılında bulunmuş ve sığır granülopati sendromu olarak adlandırılmıştır (Kehrlı ve ark., 1992a). Hasta buzağularda sindirim kanalı ve ağız mukozalarında geniş ve yaygın ülserler, diş etlerinde iltihap, erken diş kaybı, şiddetli ve iyileşmeyen ishal tablosu ile solunum sistemlerinde bronşit ve pnömoni görülmektedir (Ackermann ve ark., 1993; Akyüz ve Ertuğrul, 2006a; Craznik ve ark., 2007; Gilbert ve ark., 1993; Müeller ve ark., 1995).

Semptomların iyileştirilmesi için uygulanan tedavi sonrasında klinik belirtiler ortadan kalkmakta ancak tedavi bitiminde tekrar ortaya çıkmaktadır (Fesüs ve ark., 1999; Janosa ve ark., 1999; Kehrlı ve ark., 1992b; Sıpes ve ark., 1999). Hasta buzağılar antibiyotik tedavisine yanıt vermezler (Ackermann ve ark., 1999; Healy, 1992). Aralıklarla yapılan kan sayımında devamlı lökosit artışı görülür (Akyüz ve Ertuğrul, 2006a; Healy, 1992). Lökositlerin çoğunluğu nötrofillerdir (Akyüz ve Ertuğrul, 2006a). Sağlıklı bir buzağıda normalde 1 mm<sup>3</sup> kanda 8000 adet lökosit varken, hasta buzağılarda bu sayı 100.000'i aşmaktadır. Hasta buzağılarda büyüme geriliği ve aşırı zayıflık görülür (Akyüz ve Ertuğrul, 2006a; Kehrlı ve ark., 1992b; Olchowıy ve ark., 1994; Sağlam ve ark., 1997). Buzağuların vücut ağırlıkları yaşlılarının ancak %50-60'ına ulaşabilmektedir (Akyüz ve Ertuğrul, 2006a).

Hasta hayvanlarda doğumdan sonraki ilk bir yıl içerisinde tekrarlayan mukozal enfeksiyonlar sonucu ölüm görülmektedir (Ackermann ve ark., 1993; Akyüz ve Ertuğrul, 2006a).

Süt sığırcılığında dünyada buzağuların yaklaşık %7.7'si çeşitli nedenlerden dolayı ölmektedir. İshal nedeniyle ölen buzağuların %36'sında belirli bir mikrobik ajan belirlenmemiştir. Buna rağmen, ölüm sebebi nadiren BLAD olarak bildirilmektedir. Oysa dünya Holştayn popülasyonunun yaklaşık %5.8'i BLAD taşıyıcısıdır (Janosa ve ark., 1999). Bu nedenle, BLAD süt endüstrisini tehdit eden en önemli kalıtsal hastalıklardan biridir (Kehrlı ve ark., 1992b).

Dünyada BLAD taşıyıcılarının ABD orjinli Osborndale Ivanhoe, Penstate Ivanhoe Star ve Carlin M Ivanhoe Bell isimli yüksek süt verimine sahip boğalar ile hem anne hem de baba tarafından akraba oldukları belirlenmiştir (Agerholm ve ark., 2001; Berglund ve ark., 2004; Cıtek ve ark., 2006; Hirano ve ark., 2006; Steffen, 2001). Yüksek süt verimine sahip olmaları ve bu özelliklerini yavrularına yüksek oranda geçirebilmeleri nedeniyle bu boğaların hem kendileri hem de birçok oğul ve torunları Holştayn yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılmıştır. Bu durum, BLAD'ın önce ABD'ye, buradan da dünyaya yayılmasına neden olmuştur (Akyüz ve Ertuğrul, 2006a).

### 2.5.2. Faktör XI Eksikliği (FXID)

Kanın pıhtılaşmasında görevli proteinlerden biri olan faktör XI, serin proteaz olarak da adlandırılmaktadır (Ghanem ve ark., 2005). Hastalığın faktör XI geninin 12 numaralı ekzonuna 76 baz eklenmesine neden olan bir mutasyon sonucu meydana geldiği tespit edilmiştir (Brush ve ark., 1987; Mukhopadhyaya ve ark., 2006). İnsan, köpek ve sığırlarda tespit edilmiş kalıtsal hastalıklardan biri olduğu belirtilmiştir (Brush ve ark., 1987; Laponten ve ark., 2000).

Sığırlarda bu kalıtsal hastalık ilk kez 1969 yılında ABD Holştaynlarında tespit edilmiştir (Marron ve ark., 2004). Daha sonra Kanada ve İngiltere’de de bu kalıtsal hastalığın varlığı bildirilmiştir (Marron ve ark., 2004). Türkiye’de yetiştirilen Holştayn’larda FXID’e neden olan mutant allelin varlığı ilk kez 2009 yılında bildirilmiştir (Meydan ve ark., 2009). Faktör XI yetmezliği hayvanlarda çoğunlukla asemptomatik seyretmektedir (Citek ve ark., 2006). Gerek homozigot gerekse heterozigot bireylerde hastalığın kesin tanısına olanak verecek klinik belirtiler bulunamamıştır. FXID’den etkilenen hayvanların çoğunlukla belirgin semptomlar göstermeden de yaşayabildikleri bildirilmiştir (Citek ve ark., 2006).

Enjeksiyon sonrası kanama süresinin uzaması, kanlı süt alımı ve anemi gibi birkaç belirti görülebilmektedir (Citek ve ark., 2006; Gentry ve Black, 1980; Marron ve ark., 2004). Bu semptomlara ilaveten normal buzağılara göre daha düşük doğum ağırlığı ve yaşama oranı göstermektedirler (Marron ve ark., 2004). Normal buzağılara göre enfeksiyöz hastalıklara yakalanma olasılıklarının daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Marron ve ark., 2004).

FXID, heterozigot bireylerde pıhtılaşma aktivitesini azaltmış, homozigotlarda ise tamamen ortadan kalkmasına neden olmuştur (Meydan ve ark., 2009). Ayrıca kastrasyonda ve boynuz kesimi yapılan hayvanlarda uzun süren kanamalar, yeni doğum yapmış ineklerde sıklıkla pembe renkli kolostrum, yeni doğan buzağılarda göbek kordonunda ve çevresinde kanamalar görüldüğü bildirilmiştir (Marron ve ark., 2004; Meydan ve ark., 2009). FXID, taşıyıcı ve homozigot hayvanların ovülasyon döneminde kan östradiol oranında düşmeye ve foliküler gelişimin tamamlanmamasına neden olmaktadır (Ghanem ve ark., 2005).

Üreme performansının etkilenmesi sebebi ile işletmelerde buzağılama aralığının uzamasına neden olduğu bildirilmiştir (Ghanem ve ark., 2005). Bu durum süt endüstrisinde ekonomik kayba neden olmaktadır (Gentry ve Black, 1980; Marron ve ark., 2004).

Homozigot hasta hayvanlar, yüksek mortalite gösterebilirler bile herhangi bir klinik belirti göstermeden sürü içerisinde yıllarca yaşayabilmektedirler (Marron ve ark., 2004). Bu nedenle homozigot ve heterozigot bireylerin belirlenerek damızlıktan çıkarılması gerekmektedir. Hastalığın tanısında, bireylerdeki FXID etkinliğini izlemek için aktive parsiyel tromboplastin zamanını (APTT) ölçümü kullanılabilir (Ghanem ve ark., 2005). Yöntem, homozigot bireylerin belirlenmesi için olumlu sonuç vermesine karşın heterozigot bireylerin belirlenmesinde olumlu sonuç vermemektedir (Ghanem ve ark., 2005). Bu nedenle FXID taşıyıcılarının kesin olarak tespiti için en etkili yöntem uygun primerlerin kullanılmasıyla yapılan PZR yöntemi olduğu belirtilmiştir (Marron ve ark., 2004).

### **2.5.3. Kompleks Vertebral Malformasyon (CVM)**

Holştayn sığırlarında üridin difosfat-N-asetilglukozamin transporteri kodlayan SLC35A3 geninde meydana gelen bir mutasyon sonucu oluştuğu belirtilmektedir. Hastalık SLC35A3 geninin 559. pozisyonunda bulunan guanin nükleotidinin timin ile yer değiştirmesine neden olan nokta mutasyonu sonucu oluşur (Agerholm ve ark., 2001; Steffen, 2001). Bu mutasyon, SLC35A3 proteininin 180. pozisyonunda bulunan valin amino asidinin fenilalanine dönüşmesine sebep olmaktadır (Rezaee ve ark., 2008; Schütz ve ark., 2008).

Kompleks vertebral malformasyon (CVM), Holştayn sığırlarında görülen otozomal çekinik kalıtım şekli gösteren, öldürücü bir hastalıktır (Agerholm ve ark., 2004; Nagahata ve ark., 2009). Hastalığın, fetal gelişme bozukluğuna sebep olan omurilik anomalisi ile seyreden, fetal ölüm ve yavru atımı ile sonuçlandığı belirtilmektedir (Agerholm ve ark., 2001). Mutant allel yönünden homozigot olan fütüslerin yaklaşık % 80'i gebeliğin 260. gününden önce atılmaktadır (Agerholm ve ark., 2004).

Bu dönemden önce atılmayan ve normal gebelik süresini tamamlayan yavrular çoğunlukla ölü doğmaktadır. Atılmayan yavrularda boyun ve göğüs bölgesi omurlarında kısıalma, simetrik eklem eğrilikleri, omurilik eğriliği, vertebralarda şekil bozukluğu, kafatasından kuyruk sokumuna uzanan omurga dizisinin boyun ve sırt omurlarında birden fazla omurun anatomik olarak eksikliği ve omurlarda yapışma ile karakterizedir (Agerholm ve ark., 2001; Agerholm ve ark., 2004; Chu ve ark., 2008; Duncan ve ark., 2001; Nagahata ve ark., 2002; Revell, 2001; Thomsen ve ark., 2006). Bu klinik belirtilerden en önemlisi ve embriyo için ölümcül olanı omurga kısalığıdır (Agerholm ve ark., 2001). Homozigot yapıdaki fötüslerin %50'sinde kalp anomalisi de görülmektedir (Schütz ve ark., 2008).

Hasta buzağuların pedigrileri incelendiğinde bu yavruların ABD orjinli Penstate Ivanhoe Star ve Carlin M Ivanhoe Bell isimli boğalarla akraba oldukları belirlenmiştir. Hastalığın varlığı ilk olarak Danimarka'da bildirilmiş, daha sonraları ise birçok ülkede bu kalıtsal hastalığın varlığı tespit edilmiştir (Agerholm ve ark., 2001; Berglund ve ark., 2004; Citek ve ark., 2006; Hirano ve ark., 2006; Steffen, 2001).

## **2.6. Holştayn Sığırırkı**

Holştayn sığırırkı ırkının anavatanı Hollanda'nın Frizyan bölgesi olarak bilinmektedir. Avrupa'nın çeşitli bölgelerinde özel olarak yetiştirilen hayvanlar, Türkiye'de daha çok Marmara, Ege ve Akdeniz bölgelerinde ülkemiz şartlarına uygun olarak yetiştirilmektedir. Süt verimleri yüksek olduğundan en çok tercih edilen süt sığırlarıdır. Siyah ve beyaz renkleri birarada barındırırlar. İri yapılı olup memeleri büyük ve yumuşaktır. Bir laktasyonda 6500-9600 lt arasında süt vermektedirler (Akyüz ve Ertuğrul, 2006a).

Holştayn, dünya sığırırklarının belirleyicisi konumundadır. Bir çok ırkla melezlemesi yapılmıştır. Az verimli yerli ırklarımızın, Holştayn ırkı hayvanlar ile melezlenmesinin yerli hayvanlara göre daha çok verim sağladığı görülmüştür. Bakımı ve beslenme koşulları düzgün ise çok verimli ve kârlı bir hayvancılık yapılabilmektedir. Holştayn sığırırkı hayvanlar, hastalıklara karşı çok duyarlı olup, bakımına ve korunmasına titizlikle dikkat edilmesi gereken bir sığırırkıdır. Damızlık süt sığırcılığı yapmaya elverişli olup her türlü iklime uyum sağlamaktadırlar (Akyüz ve Ertuğrul, 2006a).

Holştayn sığır ırkının, dünyada sığırcılık projelerinde hep ön planda olduğu görülmektedir (Akyüz ve Ertuğrul, 2006a).



Şekil 2.6.1: Holştayn ırkı inek (<https://www.toptancimgazetesi.com>)



Şekil 2.6.2: Holştayn ırkı boğa (<https://www.bilgidiyari.tk>)

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. GEREÇ

##### 3.1.1. Hayvan Örnekleri

Araştırmada Kocaeli, Sakarya ve Balıkesir illerindeki ilçe ve köylerde yer alan yetiştiricilerden temin edilen 300 adet Holştayn ırkı sığırlara ait kan örnekleri kullanılmıştır.

**Kocaeli;** Kandıra Merkez- Elit Tarım ve Hayvancılık Süt üretim Merkezi (54), Aygaz Sahibi (21, 17 sığır damızlık, 4 tanesi inek), Asım Ağa Çiftliği (25), 17 damızlık sığır 83 inek toplamda 100, 2 Mart 2014 yılında kan alındı.

**Sakarya;** Karapüçek Köyü- Yüksel Mahallesi- Ali Rıza Yıldız (20), İsmet Yıldız (19), İbrahim Kulaç (18), Yıldırım Özcan (17), Tacit Şahin (12), Hasan Burnaz (9), Aydın Özcan (5), toplamda 100 inek, 8 Şubat 2014 yılında kan alındı.

**Balıkesir;** Çaypınar Köyü- Okyanus Çiftliği- 100 inek- 2. Laktasyonda, 18 Ocak 2014 yılında kan alındı.

Çalışma, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı DNA laboratuvarında, Nisan, Mayıs ve Haziran 2014 döneminde gerçekleştirilmiştir.

##### 3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazların listesi aşağıda verilmiştir.

Dijital otomatik pipet 10-100µl	(Thermo Finnipipette)
Etüv	(Dedeoğlu)
Güç Kaynağı	(Consort E833)
Hassas terazi	(Chyo MK-500C)
Kuru blok ısıtıcı	(Techne Dri-Block DB-2D)
Mini santrifüj cihazı	(Eppendorf minispın plus)

Otoklav	(Nüve OT 012)
Otomatik pipet 100-1000µl	(Biohit)
Otomatik pipet 10-100µl	(Biohit)
Otomatik pipet 0.1-2.5µl	(Biohit)
Otomatik pipet 0.5-10µl	(Biohit)
Soğutmalı santrifüj	(Sigma 3-16 K)
Thermal cycler	(Techne TC-312)
UV görüntüleme cihazı	(Kodak El Logic 200 Imaging System)
Vorteks	(Heidolph D-91126 Schwabach)
Yatay sualtı elektroforez cihazı	(Thermo EC320)

### 3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin listesi aşağıda verilmiştir.

Agaroz	(Sigma A9539)
Amonyum asetat	(Biomatik A4136)
dNTP seti 4×25µl	(Fermantas 00016618)
Eco T22 I	(Invitrogen 15240501)
EDTA	(Sigma E5134)
Etidyum Bromür	(Sigma 083K8937)
KHCO <sub>3</sub>	(Fluka 60339)
MgCl <sub>2</sub>	(Fermantas 00016395)
NH <sub>4</sub> Cl	(Biomatik A2143)
NaCl	(Sigma S3014)
Primerler	(Integrated DNA Technologies)
Proteinaz K	(Roche 03115801001)
PZR reaksiyon tamponu	(Fermantas 00016394)

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	(Multicell 800-100-EG)
Taq DNA polimeraz	(Fermantas 00016337)
TEB tampon çözeltisi	(Amresco 2758L42)
Yükleme tamponu (6X)	(Takara A129)
%99'luk absolut Etanol	(Riedel-de Haën 32221)
100 bç DNA Markör	(Fermantas 00020166)
50 bç DNA Markör	(Fermantas 00151359)

### **3.1.4. Genomik DNA Elde Edilmesinde Kullanılan Çözelti ve Tamponlar**

DNA izolasyonu işlemi için kullanılan çözelti ve tamponlar ile bunların hazırlanması aşağıda gösterilmiştir.

#### **3.1.4.1. Lizis Tamponu**

16.58 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2.0024 g  $\text{KHCO}_3$  ve 0.074 g EDTA balon jöjeye konulup, steril distile suda çözündürülerek 2 litreye tamamlanmıştır. Otoklavda  $121^\circ\text{C}$ 'de 60 dakika süreyle sterilize edildikten sonra  $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır.

#### **3.1.4.2. Nükleaz Tamponu**

4.65 g EDTA ve 2.92 g  $\text{NaCl}$  balon jöjeye konulup, steril distile suda çözündürülerek 500 ml'ye tamamlanmıştır. Otoklavda  $121^\circ\text{C}$ 'de 60 dakika süreyle sterilize edildikten sonra  $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır.

#### **3.1.4.3. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi (%10)**

10 g sodyum dodesil sülfat steril distile suda çözündürülerek 100 ml'ye tamamlanmış ve oda ısısında saklanmıştır.

#### **3.1.4.4. Amonyum Asetat Çözeltisi (4.5 M)**

34.6 g amonyum asetat steril distile suda çözündürülerek 100 ml'ye tamamlanmış ve  $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır.

### **3.1.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Çözeltiler**

Polimeraz zincir reaksiyonunda hastalıklara sebep olan mutant alleli tespit etmek için bölgelerin çalışılması için kullanılan çözelti ve maddeler ile bunların hazırlanması aşağıda gösterilmiştir.

#### **3.1.5.1. Primer Solüsyonunun Hazırlanması**

Liyofilize halde bulunan primerler öncelikle 100 µl distile suda çözündürülmüştür. Hazırlanan stok çözeltilerden 1 µl alınarak, distile su ile primerlerin sahip olduğu nmol değerine tamamlanmış ve 10 pmol/ml konsantrasyon sağlanmıştır. Kullanılmadan önce mikrosantrifüj ile karıştırılmıştır.

#### **3.1.5.2. dNTP Solüsyonunun Hazırlanması**

dATP, dTTP, dGTP ve dCTP dinükleotidlerinin her birinden 10 µl alınmış, 40µl steril distile suda çözündürülmüştür. 100 µM yoğunlukta hazırlanan dNTP karışımı mikrosantrifüj ile karıştırılmış ve -20°C'de saklanmıştır.

## **3.2. YÖNTEM**

### **3.2.1. Kan Alma İşlemi**

Holştayn ırkı sığırlardan kan örnekleri steril iğne ve kan alma aparatı ile kuyruktan 10 ml'lik etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) içeren steril tüplere alınmış, tüpler DNA izolasyonu aşamasında kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

### **3.2.2. DNA İzolasyonu**

Genomik DNA elde edilmesinde, standart amonyum asetat ile çöktürme yöntemi kullanılmıştır (Miller ve ark., 1985). Yöntemin ayrıntıları aşağıda verilmiştir.



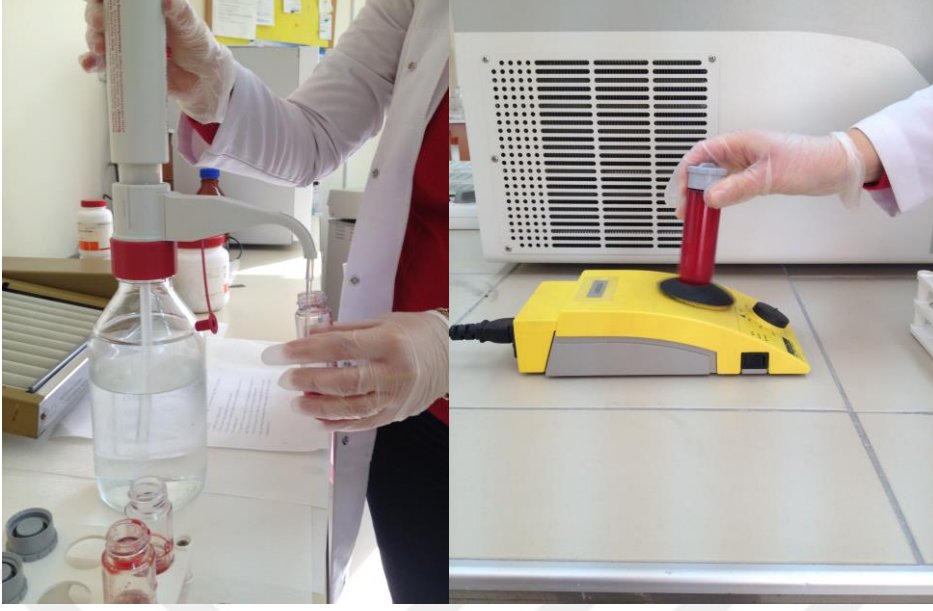
**Şekil 3.2.2.1:** Alınan kanların karıştırılması

1- EDTA'lı tüpten 2 cc kan 50 ml'lik plastik santrifüj tüpüne boşaltılmıştır.



**Şekil 3.2.2.2:** Kanların santrifüj tüpüne alınması

2- Üzerine 15 ml'e kadar Lyzis Buffer eklenmiş ve vortekslenmiştir.



**Şekil 3.2.2.3:** Lyzis buffer eklenmesi ve vorteksleme

3- 15 dakika buzdolabında bekletilmiştir (+4<sup>0</sup>C).



**Şekil 3.2.2.4:** Buzdolabında bekletme



**Şekil 3.2.2.5:** Santrifügasyon

- 4- 6600 d/d'da 11 dakika çevrilmiştir (+4°C).
- 5- Üst sıvı pellete zarar vermeden dökülmüştür.



**Şekil 3.2.2.6:** Üst sıvının dökülmesi

- 6- Pellet üzerine 10 ml'e kadar Lyzis Buffer eklenmiş ve vorteksenmiştir.



**Şekil 3.2.2.7:** Lysis buffer ekleme ve vorteksleme

7- 6600 d/d'da 11 dakika çevrilmiştir (+4°C) (santrifüjden çıkarıldığında çeperde kan sıvanması kalmamışsa yıkanma işlemi başarılı demektir)



**Şekil 3.2.2.8:** Pelletin üst sıvıdan ayrılmamış hali

8- Üst sıvı pellete zarar vermeden dökülmüştür.



Şekil 3.2.2.9: Pellete zarar vermeden üst sıvının ayrılması

9- Pellet üzerine 3 ml nükleaz buffer, 400µl steril su, 50µl sodyum dodesil sülfat, 30µl Proteinaz K eklenmiştir.



Şekil 3.2.2.10: Pellet üzerine eklenen çözeltiler

10- 37°C’de 1 gece inkübe edilmiştir.



Şekil 3.2.2.11: İnkübasyon

11- İnkübasyondan sonra tüpe 1.8 ml amonyum asetat eklenip vortekslenmiştir.



Şekil 3.2.2.12: Amonyum asetat eklenmesi ve vorteksleme

12- 10600 d/d’da 25 dakika çevrilmiştir (+4°C).

13- Üst sıvı pellet karıştırılmadan başka bir 50 ml'lik plastik santrifüj tüpüne alınmıştır.



**Şekil 3.2.2.13:** Tüpün içeriğini başka bir falkona boşaltma

14- Yeni tüpteki sıvı %99'luk soğuk mutlak etanol ile 10-15 ml'e kadar tamamlanmıştır.

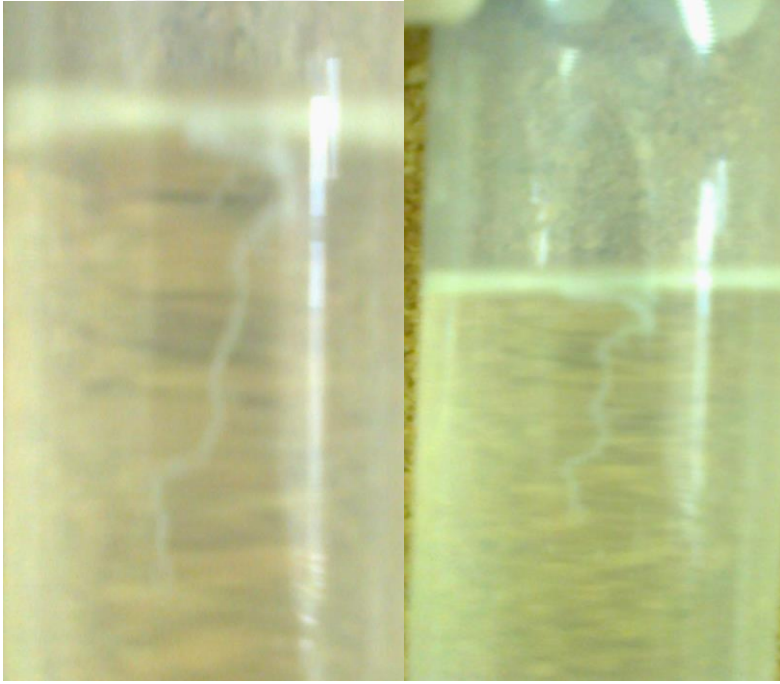


**Şekil 3.2.2.14:** Mutlak etanol ile muamele

15- Tüp hafifçe alt üst edilerek çalkalanmış ve DNA ipliğinin oluştuğu görülmüştür.



Şekil 3.2.2.15: DNA iplikçığı



Şekil 3.2.2.15: DNA iplikçığı

16- Steril uç ile alınan DNA iplikçığı, 400 µl steril su konmuş mikro santrifüj tüpüne alınarak, çözünmesi için oda ısısında birkaç gün bekletilmiştir.

Elde edilen genomik DNA örnekleri etiketlenerek çalışmada kullanılmaya kadar -86<sup>0</sup>C'de muhafaza edilmiştir.

DNA izolasyon işleminin sonunda 300 adet Holştayn ırkı sığira ait kan örneklerinin tamamından genomik DNA izole edilebilmiştir.

### 3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Sığır lökosit bağlanma yetmezliği (BLAD)'ne sebep olan mutant alleli belirlemek için yapılan PZR işleminde aşağıdaki primerler kullanılmıştır (Meydan ve ark., 2010).

F: 5'GAATAGGCATCCTGCATCATATCCACCA3'

R: 5'CTTGGGGTTTCAGGGGAAGATGGAGTAG3'

BLAD geni 357 bç'lik hedef bölgenin çoğaltılmasında kullanılacak PZR şartları: 94<sup>0</sup>C'de 5 dakika, 94<sup>0</sup>C'de 1 dakika, 61<sup>0</sup>C'de 1 dakika, 72<sup>0</sup>C'de 1 dakika, 35 siklus ve 72<sup>0</sup>C'de 10 dakikadır. Hedef bölgenin çoğaltılması için kullanılan 25 µl PZR karışımındaki solüsyonlar ve miktarları Tablo 3.2.3.1'de verilmiştir.

Faktör XI eksikliği (FXID)'ne sebep olan mutant alleli belirlemek için yapılan PZR işleminde aşağıdaki primerler kullanılmıştır (Yaşar ve Akyüz, 2012).

F: 5'CCCACTGGCTAGGAATCGTT3'

R: 5'CAAGGCAATGTCATATCCAC3'

FXID geni 320 bç'lik hedef bölgenin çoğaltılmasında kullanılacak PZR şartları: 94<sup>0</sup>C'de 5 dakika, 94<sup>0</sup>C'de 1 dakika, 54<sup>0</sup>C'de 1 dakika, 72<sup>0</sup>C'de 1 dakika, 35 siklus ve 72<sup>0</sup>C'de 10 dakikadır. Hedef bölgenin çoğaltılması için kullanılan 25 µl PZR karışımındaki solüsyonlar ve miktarları Tablo 3.2.3.1'de verilmiştir.

Kompleks vertebral malformasyon (CVM)'a neden olan mutant alleli belirlemek için yapılan PZR işleminde aşağıdaki primerler kullanılmıştır (Kulaklı ve Akyüz, 2011).

F: 5' CACAATTTGTAGGTCTCACTGCA3'

R: 5' CGATGAAAAAGGAACCAAAAGGG3'

CVM geni 233 bç'lik hedef bölgenin çoğaltılmasında kullanılacak PZR şartları: 96<sup>0</sup>C'de 5 dakika, 95<sup>0</sup>C'de 30 saniye, 56<sup>0</sup>C'de 1 dakika, 72<sup>0</sup>C'de 30 saniye, 30 siklus ve 72<sup>0</sup>C'de 10 dakikadır. Hedef bölgenin çoğaltılması için kullanılan 25 µl PZR karışımındaki solüsyonlar ve miktarları Tablo 3.2.3.1'de verilmiştir.

**Tablo 3.2.3.1: Hedef bölgenin çoğaltılması için kullanılan PZR karışımındaki solüsyonlar ve miktarları**

Solüsyonlar	Konsantrasyon	Miktar (1X)
Steril distile su		14.9
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 µl
dNTP	100 µM	0.4 µl
Primer-1	10 pmol/µl	1 µl
Primer-2	10 pmol/µl	1 µl
Taq DNA polimeraz	1 U	0.2 µl
DNA	50-100 ng	3 µl
PZR tamponu	10X Taq Buffer with (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.5 µl

#### 3.2.4. Agaroz Jelin Hazırlanması ve PZR Ürünlerinin Yürütülmesi

Elde edilen PZR ürünlerinin yatay sualtı elektroforezinde yürütülmesi için öncelikle % 2 agaroz jel hazırlanmıştır. Bu amaçla bir behere 30 ml 0.5 X TEB tampon çözeltisi ve 0.6 g agaroz konularak manyetik ısıtıcı yardımıyla berraklaşmaya kadar çözündürülmüştür. Berraklaşan jele ısıtma aşamasında, yürütülen DNA parçacıklarının görünür hale gelebilmesi için 1.5 µl etidyum bromür eklenerek karıştırılmıştır. Hazırlanan jel, 55-60 <sup>0</sup>C'ye kadar soğuması beklendikten sonra hava kabarcığı oluşmamasına özen gösterilerek tarakların yerleştirildiği jel tankına dökülmüştür.



### 3.2.7. Dizin Analizi

Çalışmamızda dizin analizi işlemi Refgen-Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti. (Gölbaşı-Ankara) laboratuvarı tarafından gerçekleştirilmiştir. PZR ürünlerinin saflaştırılıp forward primer vasıtasıyla dizinleme işlemi kılcal elektroforez (ABI 3130 XL Genetic Analyzer, USA) cihazında yapılmıştır.

### 3.2.8. İstatistiksel Analiz

Dizin analizi sonuçları öncelikle Clustal W karşılaştırma programı bazlı çalışan MEGA 4 (Tamura ve ark., 2007) ([http://www.megasoftware.net/m\\_con\\_select.html](http://www.megasoftware.net/m_con_select.html)) bilgisayar programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Dizin analizi gerçekleştirilen her bir örneğin polimorfizmine bakmak için genotip ve allel dağılımı ile ki-kare ( $\chi^2$ ) testi sonucu Hardy-Weinberg eşitliğine uyum PopGene32 bilgisayar programı kullanılarak analiz edilmiştir (Yeh ve ark., 2000).

### 3.2.9. Etik Kurul Onay Bilgileri

Etik kurul adı: İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

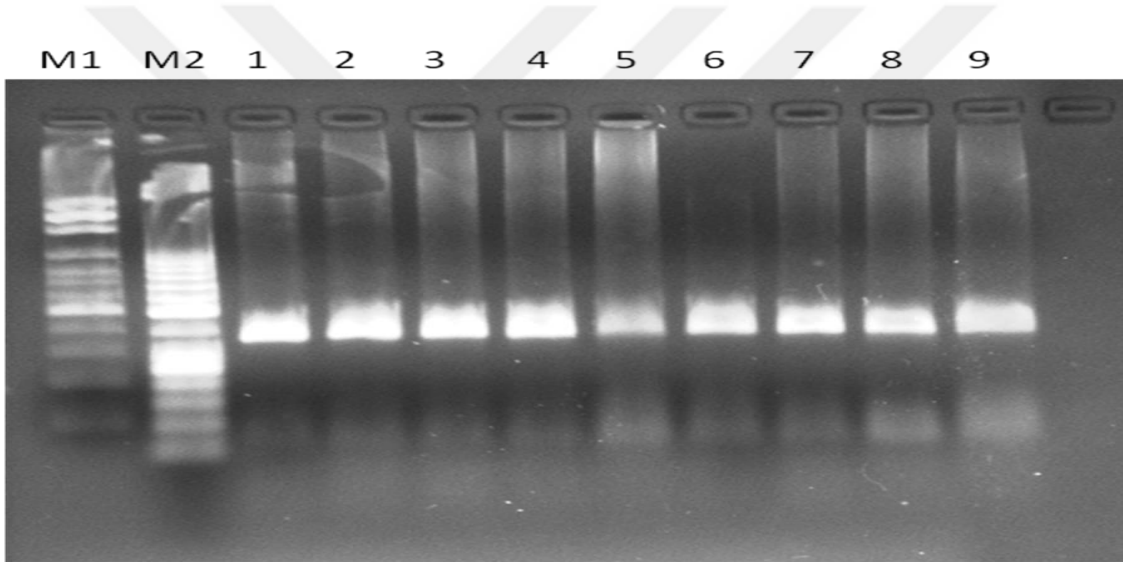
Etik kurul kararının tarihi: 30.09.2013

Etik kurul kararının sayısı: 103

## 4. BULGULAR

### 4.1. Sığır Lökosit Bağlanma Yetmezliği (BLAD)

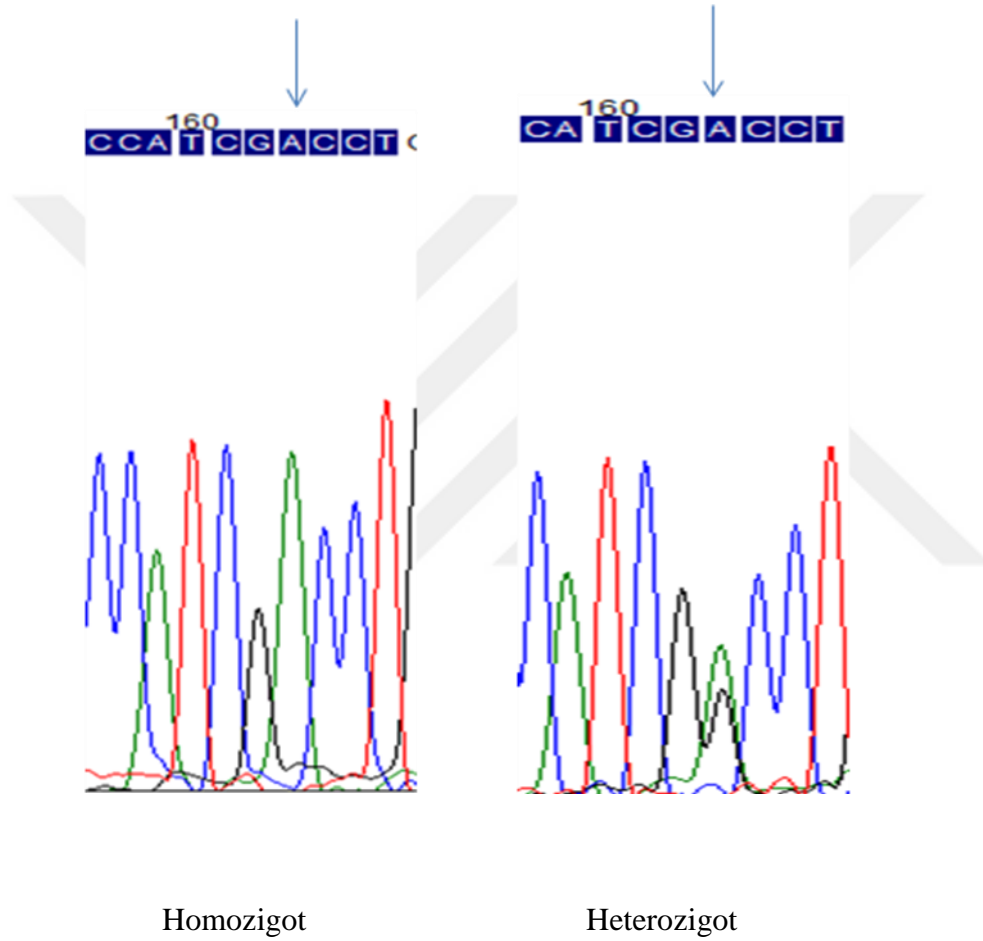
Kocaeli, Sakarya ve Balıkesir illerindeki Holştayn ırkı sığırlarda Sığır Lökosit Bağlanma Yetmezliği (BLAD) hastalığına ait sonuçlarda; PZR işlemi ile istenilen bölgesi çoğaltılan CD18 genine ait agaroz jel görüntüsü Şekil 4.1.1’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.1.1: CD18 geninin 383. nükleotidindeki hedef bölgenin %2’lik agaroz jeldeki görüntüsü**

M1: 100 bç DNA Markör M2: 50 bç DNA Markör, 1-9: 357 bç’lik hedef bölge

Elde edilen bu PZR sonuçları dizin analizi işlemine tabi tutulmuş olup, toplamda 300 sığırdan 4 tanesi heterozigot birey, 296 tanesi homozigot birey olarak tespit edilmiştir. Şekil 4.1.2’de heterozigot bireyin kromotogramı gösterilmiştir.



**Şekil 4.1.2: Homozigot ve heterozigot bireylerin nükleotid kromotogramı**

Bu sonuçlar ışığında, yapılan çalışmada Sığır Lökosit Bağlanma Yetmezliği (BLAD) hastalığı ile ilgili polimorfizm genotip ve allel frekansları Tablo 4.1’de verilmiştir.

**Tablo 4.1 :** Holştayn ırkı sığırlarda CD18 geni polimorfizminin genotip ve allel frekansları

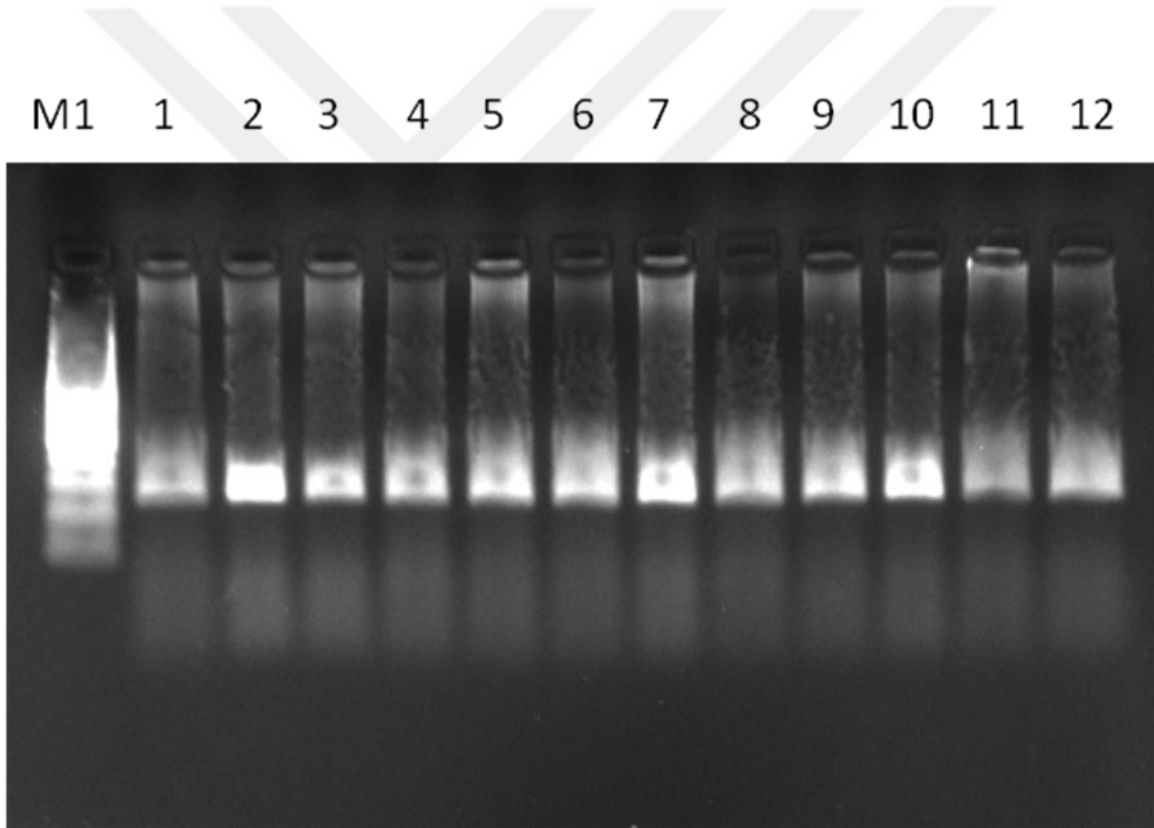
		Genotip				Allel Frekansı (%)		
		AA		AG		A	G	
İrk	n <sup>1</sup>	Göz. <sup>2</sup>	Bek. <sup>3</sup>	Göz. <sup>2</sup>	Bek. <sup>3</sup>			(x <sup>2</sup> ) <sup>4</sup>
Holştayn	300	296	296.01	4	3.980	0.9933	0.0067	0.0101 Ns

<sup>1</sup> hayvan sayısı, <sup>2</sup> gözlenen değerler, <sup>3</sup> beklenen değerler

<sup>4</sup> Hardy-Weinberg eşitliğine uyum, Ns: önemsiz

#### 4.2. Faktör XI Eksikliği (FXID)

Sakarya, Kocaeli ve Balıkesir illerindeki Holştayn ırkı sığırlarda PZR işlemi ile istenilen bölgesi çoğaltılan faktör XI genine ait agaroz jel görüntüsü Şekil 4.2.1’de gösterilmiştir. PZR sonucunda taşıyıcı bireyde 244 ve 320 bç’lik iki bant, homozigot bireylerde ise 244 bç’lik tek bant görülmesi beklenmiştir. İncelenen 300 örnekten hiçbirinde iki bant gözlenmemiştir. Dolayısıyla tüm örnekler homozigot normal bireyler olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.2.1)

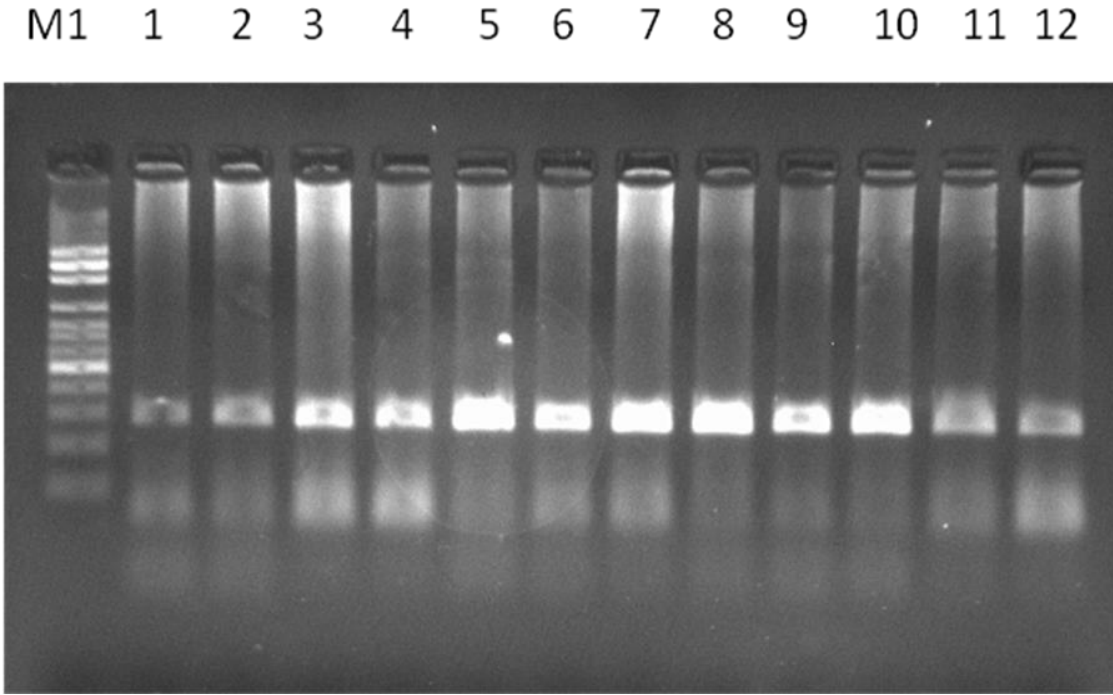


**Şekil 4.2.1: Faktör XI geni 12. ekzon 244 bç’lik hedef bölgesinin %2’lik agaroz jeldeki görüntüsü**

M1: 100 bç DNA Markör, 1-12: 244 bç’lik hedef bölge

### 4.3. Kompleks Vertabral Malformasyon (CVM)

Sakarya, Kocaeli ve Balıkesir illerindeki Holştayn ırkı sığırlarda Kompleks Vertabral Malformasyon hastalığına ait sonuçlarda; PZR işlemi ile istenilen bölgesi çoğaltılan SLC35A3 genine ait agaroz jel görüntüsü Şekil 4.3.1’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.3.1: SLC35A3 geni 4. ekzon 233 bç’lik hedef bölgesinin %2’lik agaroz jeldeki görüntüsü**

M1: 100 bç DNA Markör, 1-12: 233 bç’lik hedef bölge

PZR ile elde edilen 233 bç’lik ürünlerin EcoT22 restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucunda incelenen bireylere ait PZR ürünlerinin hiçbirinin bu enzim ile kesilmediği gözlemlenmiştir. Dolayısıyla incelenen bireylerin hiç birisinde CVM taşıyıcı bireylerde görülmesi beklenen 233, 212 ve 21 bç’lik üç bant görüntülenememiştir. Tüm bireylerde 233 bç’lik tek bant görülmüştür ve tüm bireylerin homozigot normal olduğu belirlenmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Dünyada süt endüstrisi gün geçtikçe artan ihtiyaç dahilinde önem kazanmaktadır. Süt endüstrisinin ihtiyacını karşılamak amacıyla suni tohumlama yöntemi oldukça sık kullanılmaktadır (Citek ve ark., 2006). Suni tohumlama yöntemi süt üretimini laktasyon başına 900 lt kadar arttırmaktadır (Mukhopadhyaya ve ark., 2006). Bu yöntemin oldukça sık kullanılması aynı tohumun birden fazla kullanılmasına ve ırk içindeki genetik benzerliğin artmasına neden olmaktadır (Thomsen ve ark., 2006). Genetik benzerliğin artışı sebebiyle döl verimini düşürmekte ve dolaylı yoldan süt üretiminin kalitesinde azalmaya neden olacak kalıtsal hastalıkların artmasına zemin hazırlamaktadır (Akyüz ve ark., 2008; Mukhopadhyaya ve ark., 2006). Kalıtsal hastalıkların artmasına ve dünyaya yayılmasına neden olmaktadır (Mukhopadhyaya ve ark., 2006).

Kalıtsal hastalıklar anne ve babadan yavruya geçen genetik kodlarda bozukluklara neden olmaktadır. Genetik bozulmalar kendiliğinden ya da çevrenin etkisiyle meydana gelebilmektedir. Bu durum protein sentezinin bozulmasına neden olmaktadır (Başaran, 1996). Hayvanın sağlığının bozulmasına ve ekonomik kayıplara sebep olabilmektedir (Citek ve ark., 2006). Bu nedenle kalıtsal hastalıklar hakkında bilgi sahibi olmak hastalıkları sürüden uzaklaştırmada büyük önem taşımaktadır (Citek ve ark., 2006).

Kalıtsal bozukluğun genetik temelini aydınlatılmasından sonra geliştirilen ve DNA kullanılarak yapılan testler, hasta, normal ve taşıyıcılar hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlamaktadırlar. Moleküler tanı teknikleri, kalıtsal hastalıktan sorumlu genin kendisinin veya yerinin belirlenmesi esasına dayalı testlerdir (Wood ve Langlois, 1991). Moleküler tanı yöntemlerinin daha doğru, daha ucuz ve daha hızlı sonuç vermeleri nedeniyle en yaygın kullanılan testler olduğu bilinmektedir (Akyüz ve Ertuğrul, 2006a).

Araştırmamızda, tüm dünyada yetiştiriciliği yaygın olarak yapılan Holştayn ırkı sığırların genetik hastalıklarından 3 önemli hastalık moleküler tanı yöntemlerinden polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi kullanılarak taranmıştır.

Bu çalışmada BLAD, FXID ve CVM hastalıklarına sebep olan genlerin allel frekanslarının belirlenmesi Kocaeli, Sakarya ve Balıkesir illerinde daha önce yapılmamıştır.

BLAD, Holştayn sığır ırkında tespit edilmiştir. Hasta buzağuların doğumundan itibaren ortaya çıkan ve buzağıda en geç bir yıl içerisinde tekrarlayan mukozal enfeksiyonlar nedeniyle ölmesine neden olmaktadır. BLAD, otozomal resesif kalıtım şekli gösteren kalıtsal bir hastalıktır (Ackermann ve ark., 1993; Batt ve ark., 1994; Sipes ve ark., 1999; Tammen ve ark., 1996).

Sığır lökosit bağlanma yetmezliği hastalığına ait sonuçlarda; PZR-RFLP işlemi ile istenilen bölgesi çoğaltılan ve kesilen CD18 genine ait polimorfizmin agaroz jeldeki görüntüsüne göre 313 ve 54 bç'lik iki bant oluşması durumu bize sağlıklı bireyi gösterirken; 367, 313 ve 54 bç'lik üç bant oluşması taşıyıcı bireyi göstermektedir (Khade ve ark., 2014). Yaptığımız çalışmada örneklerimiz PZR işlemi ile çoğaltıldıktan sonra dizin analizi işlemine tabi tutulmuştur. Dolayısıyla yaptığımız çalışmada örneklerde bant oluşumu gözlenmemiştir.

Holştayn ırkı sığırlarda yapılan bazı çalışmalara göre, Hindistan'da 50 sığırın tümü homozigot normal (Khade ve ark. 2014); Brezilya'da 777 sığırdan 6 tanesi taşıyıcı diğerleri homozigot normal (% 0.77) (Paiva ve ark., 2013); Çin'de 581 sığırın homozigot normal 8 sığırın ise BLAD taşıyıcısı olarak (Zhang ve ark., 2012) bulunduğu ifade edilmiştir (%1.37). Patel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre Hindistan'da 40 sığır homozigot normal bulunurken 2 sığırın taşıyıcı olduğu gösterilmiştir (%5). Çinde yapılan bir çalışmaya göre Holştayn ırkı 615 adet sığırdan 3 tanesi BLAD taşıyıcısı (Li ve ark., 2011) olup frekansı %0.48 olarak bulunmuştur, Hindistanda yapılan diğer bir çalışmaya göre ise 2 adet sığırın taşıyıcı, 118 sığırın homozigot normal olduğu (Roy ve ark., 2012) belirtilmiştir (%1.69). Hemati ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre İran'da 50 sığırdan 33 tanesinin BLAD taşıyıcısı olduğu bildirilmiştir (%6.6). Ülkemizde yapılan iki çalışmadan Antalya ve civarında yapılan araştırmaya göre 504 Holştayn ırkı sığırdan 11 tanesi BLAD taşıyıcısı (Şahin ve ark., 2013) olduğu (%2.18) tespit edilmiştir. Burdur yöresinde yapılan çalışmaya göre ise 500 adet sığırdan 10 tanesinin taşıyıcı olduğu ifade edilmektedir ve frekansı %2 'dir (Korkmaz Ağaoğlu ve ark., 2015).

Araştırmamızda Kocaeli, Sakarya ve Balıkesir bölgesindeki Holştayn ırkı 300 adet sığırdan 4 tanesinin BLAD taşıyıcısı olduğu sekans verileri sonucuna göre tespit edilmiştir. Yaptığımız çalışmada frekans %1.33 olarak hesaplanmıştır. Elde ettiğimiz verilere göre Brazilya ve Çin’de yapılan çalışmalardan frekansımız yüksek; Hindistan, İran, Antalya ve Burdur’daki çalışmalara göre ise frekansımız düşük bulunmuştur. Kocaeli, Sakarya ve Balıkesir illerinde daha fazla sayıda Holştayn sığır bulunduğunu göz önüne alırsak çalışmadaki hayvan sayısının arttırılmasıyla frekansın değişimi söz konusu olabilir.

Yapılan istatistiki sonuca göre ileride taşıyıcı olması beklenen birey sayısı 3.98 olarak hesaplanmıştır. İleride bu oranda istatistiki anlam ifade edecek bir değişiklik beklenmemekte ve Hardy-Weinberg eşitliğine uygun dağılım göstermekte olup bu durum istatistiki açıdan bir önem arz etmemektedir. Fakat taşıyıcı bireylerin sürüden uzaklaştırılmaları ileride taşıyıcı yada hasta bireylerin ortaya çıkışının önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Taşıyıcı bireyler seleksiyon çalışmalarında kullanılmamalıdır. Bireyler erkek ise spermaları kullanılmamalı, dişi ise gebe bırakılmamalıdır. Ayrıca sürüden uzaklaştırılmaları açısından kesime ilk bu bireyler gönderilmelidir. Yaptığımız çalışmada taşıyıcı olarak tespit ettiğimiz hayvanlar dişi olup bu hayvanların gebe bırakılmaması gerekmektedir.

Bir bölgede meydana gelen hastalıkları etkileyen bazı föktörler vardır. Bu faktörlerin başında son 10 yıldaki bölgesel sperm ithalatının etkisi, bu spermelerin tohumlamada kullanılma sıklığı, genetik defektli hayvan girişinin olup olmadığı, döllemede suni tohumlama yada köy boğasının kullanılıp kullanılmadığı gibi etkenler yer alır. Yaptığımız çalışmada kanlarını aldığımız hayvanlar Amerika’dan ithal edilmiş hayvanlar olup, yukarıda vurguladığımız nedenlerden etkilenmiş olduğunu düşünebiliriz.

Sığırlarda FXID hastalığı ilk kez 1969 yılında ABD Holştaynlarında tespit edilmiştir (Marron ve ark., 2004). Daha sonra Kanada ve İngiltere’de de bu kalıtsal hastalığın varlığı bildirilmiştir (Marron ve ark., 2004). Türkiye’de yetiştirilen Holştayn’larda FXID’e neden olan mutant allelin varlığı ilk kez 2009 yılında bildirilmiştir (Meydan ve ark., 2009).

Faktör XI eksikliği hayvanlarda çoğunlukla asemptomatik seyretmektedir (Citek ve ark., 2006). Gerek homozigot gerekse heterozigot bireylerde hastalığın kesin tanısına olanak verecek klinik belirtiler bulunamamıştır. Faktör XI yetmezliğinden etkilenen hayvanların çoğunlukla belirgin semptomlar göstermeden de yaşayabildikleri bildirilmiştir (Citek ve ark., 2006).

Faktör XI eksikliği hastalığına ait sonuçlarda; PZR işlemi ile istenilen bölgesi çoğaltılan genin polimorfizmine ait agaroz jeldeki görüntüsüne göre 244 ve 320 bç'lik iki bant oluşması durumu bize taşıyıcı bireyi gösterirken; 244 bç'lik tek bant oluşması homozigot normal bireyi göstermektedir (Akyüz, 2013). Yapılan bazı çalışmalara göre aşağıdaki bulgular elde edilmiştir. İzmir ve Ankara'daki toplamda 59 Holştayn ırkı sığırdan yapılan çalışmaya göre yalnız bir adet sığırın FXID taşıyıcısı olarak bulunduğu ifade edilmiştir (%1.69) (Akyüz, 2013). Karşı ve arkadaşlarının Antalya ve yöresindeki 504 holştayn ırkı sığırdan yaptıkları çalışmada 2 taşıyıcı bireyin tespit edildiği belirtilmiştir (%0.4). 2012 yılında Bagheri ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre İran'da 300 adet sığırın tümünün homozigot normal olarak bulunduğu bildirilmiştir. Eydivandi ve arkadaşlarının İran'da yaptığı diğer bir çalışmada da 330 adet sığırdan hiçbirinin taşıyıcı olmadığı belirtilmiştir. Hindistanda 2016 yılında yapılan bir çalışmaya göre 118 Holştayn ırkı sığırın homozigot normal ve 2 adet sığırın taşıyıcı olduğu bildirilmiştir, frekansı %1.69'dur (Mondal ve ark., 2016). Türkiye'de Kayseri civarında yapılan bir çalışmada 1 bireyin FXID taşıyıcısı 149 bireyin ise normal bireyler olduğu ifade edilmiştir (%0.67) (Yaşar ve Akyüz, 2012). Burdur yöresinde yapılan bir diğer çalışmaya göre 500 sığırdan 9 tanesinin FXID taşıyıcısı olduğu bildirilmiştir (%1.8) (Korkmaz Ağaoğlu ve ark., 2015).

Araştırmamızda Kocaeli, Sakarya ve Balıkesir bölgesindeki holştayn ırkı 300 adet sığırın tümü homozigot normal bireyler olarak tespit edilmiştir frekans ise %0'dır. Çalışmamızdaki veriler yapılan diğer çalışmaların frekansına göre düşük bulunmuştur. Frekans İran'daki çalışmalar ile benzer olup bu durum İran'a son yıllarda uygulanan amborgo nedeniyle hayvan giriş çıkışının olmamasından kaynaklanabilir. Hayvan giriş çıkışının olmaması aynı boğaların suni tohumlamada kullanılmasına ve hastalık yapıcı genin bu boğalarda bulunmaması hastalığın diğer hayvanlarda da ortaya çıkışına engel olabilir.

Kompleks vertebral malformasyon (CVM), Holştayn sığırlarında görülen otozomal çekinik kalıtım şekli gösteren, öldürücü bir hastalıktır (Agerholm ve ark., 2004; Nagahata ve ark., 2009). Hastalığın, fetal gelişme bozukluğuna sebep olan omurilik anomalisi ile seyreden, fetal ölüm ve yavru atımı ile sonuçlandığı belirtilmektedir (Agerholm ve ark., 2001). Mutant allel yönünden homozigot olan fütüslerin yaklaşık % 80'i gebeliğin 260. gününden önce atılmaktadır (Agerholm ve ark., 2004). Bu dönemden önce atılmayan ve normal gebelik süresini tamamlayan yavrular çoğunlukla ölü doğmaktadır (Agerholm ve ark., 2001; Agerholm ve ark., 2004; Chu ve ark., 2008; Duncan ve ark., 2001; Nagahata ve ark., 2002; Revell, 2001; Thomsen ve ark., 2006).

Atılmayan yavrularda boyun ve göğüs bölgesi omurlarında kısılma, simetrik eklem eğrilikleri, omurilik eğriligi, vertebralarda şekil bozukluğu, kafatasından kuyruk sokumuna uzanan omurga dizisinin boyun ve sırt omurlarında birden fazla omurun anatomik olarak eksikliği ve omurlarda yapışma ile karakterizedir (Agerholm ve ark., 2001; Agerholm ve ark., 2004; Chu ve ark., 2008; Duncan ve ark., 2001; Nagahata ve ark., 2002; Revell, 2001; Thomsen ve ark., 2006).

CVM hastalığına ait sonuçlarda; PZR işlemi ile istenilen bölgesi çoğaltılan genin polimorfizmine ait agaroz jeldeki görüntüsüne göre 233, 212 ve 21 bç'lik üç bant oluşması durumu bize taşıyıcı bireyi gösterirken; 233 bç'lik tek bant oluşması homozigot normal bireyi göstermektedir (Kulaklı ve Akyüz, 2011). Holştayn ırkı sığırlarda yapılan bazı çalışmalara göre, İran'da 120 sığırdan 26 tanesi taşıyıcı (Saber ve ark., 2014) frekansı %21,6; 50 bireyden 17 tanesi taşıyıcı diğerleri homozigot normal (Hemati ve ark., 2015) frekansı %34; Slovakya'da 45 sığırın homozigot normal 2 sığırın ise CVM taşıyıcısı olarak (Gabor ve ark., 2012) bulunduğu ifade edilmiştir (%4.4). Paiva ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre Brezilya'da 783 sığırdan 12 tanesinin CVM taşıyıcısı olduğu gösterilmiştir (%1.53). Çinde 2012 yılında yapılan bir çalışmaya göre 531 Holştayn ırkı sığır homozigot normal, 56 sığırın ise CVM taşıyıcısı olduğu bildirilmiştir (%10.48) (Zhang ve ark., 2012). 2011 yılında Kayseri ve civarında Kulaklı ve Akyüz'ün yaptığı çalışmada 150 sığırın tümünün homozigot normal bireyler olduğu ifade edilmiştir. Kotikalapudi ve arkadaşlarının Hindistan'da yaptığı çalışmada 1 bireyin CVM taşıyıcısı olduğu 59 bireyin homozigot normal olduğu belirtilmiştir (%1.66). Wang ve arkadaşlarının Çin'de yaptığı çalışmada 342 Holştayn ırkı sığırdan

10 tanesinin taşıyıcı bireyler olduğunu ifade etmişlerdir (%2.92). 2012 yılında Çin’de yapılan bir diğer çalışmaya göre ise 24 bireyin CVM taşıyıcısı olduğu 130 bireyin normal bireyler olduğu belirtilmiştir (%15.58) (Wang ve ark., 2012).

Araştırmamızda Kocaeli, Sakarya ve Balıkesir bölgesindeki Holştayn ırkı 300 adet sığırın tümü homozigot normal bireyler olarak tespit edilmiştir ve frekans %0’dır. Çalışmamızda elde ettiğimiz frekans yapılan diğer çalışmalara göre düşük bulunmuştur. Yapılan araştırmalarda CVM hastalığının bulunma sıklığının diğer hastalıklara göre daha yüksek olduğu vurgulanmıştır. CVM hastalık genini taşıyan hayvanların, suni tohumlama yada normal yollarla döllenmenin gerçekleşmesinde daha çok kullanıldığı sonucunu ortaya koyar. Araştırmamızda kullandığımız hayvan sayısının artırılması bu hastalığa ait frekansın değişimine neden olabilir.

Çiftlik hayvanlarının yetiştiriciliği için kullanılan türlerde ve ırklarda meydana gelen genetik varyasyonların önlenmesi ekonomik kayıpların en aza indirilmesinde rol oynamaktadır. Moleküler genetik alanında yapılan çalışmalar, doğumda veya yaşamın ileriki dönemlerinde ortaya çıkabilecek anomalilerin en aza indirgenmesinde faydalı olmaktadır (Ackermann ve ark., 1993). Birçok kalıtsal hastalığın resesif kalıtım yolu izlediği düşünüldüğünde heterozigot bireylerin ne kadar önemli rol oynadığı anlaşılabilir (Ghanem ve ark., 2006). Heterozigot bireyler herhangi bir belirti göstermeden yıllarca yaşamlarını sürdürebilmektedir. Fakat mutant alleli bir sonraki nesile aktarma ihtimali %50 olduğundan sürüden uzaklaştırılmaları gerekmektedir (Ghanem ve ark., 2008).

Çalışmamızda; Kocaeli, Sakarya ve Balıkesir illerinde yetiştirilen 300 baş Holştayn ırkı sığır incelenmiş ve 4 adet BLAD hastalığı taşıyıcısı bulunmuş olup FXID ve CVM hastalıklarının taşıyıcısı bulunmamıştır. Yapılan çalışmada Türkiye’deki Holştayn ırkı sığırlarda BLAD, FXID ve CVM hastalıklarına sebep olan mutant allellerin araştırılması ve ileride damızlık adaylarının bu hastalıklar yönünden taranabilmesi ve uygulanabilir bir yöntemin belirlenebilmesi amaçlanmıştır.

Türkiye’deki Holştayn popülasyonun sayısı düşünüldüğünde BLAD, FXID ve CVM hastalıklarını taşıyan daha çok bireyin olma ihtimali sonucunu doğurur. Dolayısıyla Türkiye’nin farklı bölgelerinde yetiştirilen Holştayn ırkı damızlık adaylarının taranmasına yönelik çalışmaların sayısı artırılmalıdır.

## KAYNAKLAR

- Ackermann, M.R., Kehrli, M.E., Morfitt, D.C. (1993) Ventral dermatitis and vasculitis in a calf with bovine leukocyte adhesion deficiency, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 202: 413-415.
- Ackermann, M.R., Brogden, K.A., Florance, A.F., Kehrli, M.E. (1999) Induction of CD18-mediated passage of neutrophils by *Pasteurella haemolytica* in pulmonary bronchi and bronchioles, *Infection and Immunity*, 67: 659-663.
- Agerholm, S., Bendixen, C., Andersen, O., Arnbjerg, J. (2001) Complex vertebral malformation in Holstein calves, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13: 283-289.
- Agerholm, J.S., Andersen, O., Almskou, M.B., Bendixen, C., Arnbjerg, J., Aamand, G.P., Nielsen, U.S., Panitz, F., Petersen, A.H. (2004) Evaluation of the inheritance of the complex vertebral malformation syndrome by breeding studies, *Acta Veterinaria Scandinavica*, 45: 133-137.
- Akyüz, B. (2004) Türkiye'deki Holştayn sığırlarında sığır lökosit bağlanma yetmezliğinin (bovine leukocyte adhesion deficiency, BLAD) restriksiyon parçacık uzunluk polimorfizmi (restriction fragment length polymorphism, RFLP) ile belirlenmesi, Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Zootekni Programı.
- Akyüz, B. (2013) Türkiye'deki iki farklı işletmede yetiştirilen Holştayn boğalarda faktör XI yetmezliği (FXID) allel frekansının belirlenmesi, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(1): 127-131.
- Akyüz, B., Ertuğrul, O. (2006a) Detection of the bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in Turkish native and Holstein cattle, *Acta Veterinaria Hungarica*, 54: 173-178.

- Akyüz, B., Ertuğrul, O. (2006b) Veteriner Hekimlikte Kalıtsal Bozuklukların Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 3(1): 53-56.
- Akyüz, B., Ertuğrul, O. (2008) Türkiye’de Holştayn ve yerli sığırlarda üridin monofosfat sentetaz eksikliği (DUMPS) belirlenmesi, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 55: 57-60.
- Akyüz, B., Bayram, D., Ertuğrul, O., İşcan, K.M. (2008) Türkiye’de yetiştirilen Holştayn ve bazı yerli sığır ırklarında Citrullinemia allelinin belirlenmesi, *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 5(1): 17-20.
- Alpan, O., Akcan, A., Poyraz, Ö. (1990) Temel Genetik, *Ankara: Ankara Üniversitesi Yayınları*, 126-135.
- Arda, M. (1995) Biyoteknoloji, *Ankara: Kükem Derneği Bilimsel Yayınları*, 211: 358-368.
- Arnheim, N. ve Erlich, H. (1992) Polymerase chain reaction strategy. *Annual review of Biochemistry*, 61, 131-156.
- Bagheri, S., Amirinia, C., Chamani, M., Aminafshar, M., Sadeghi, A.A., Seyedabadi, H.R. (2012) Identification of factor XI deficiency in Khuzestan Buffalo population of Iran, *Global Veterinaria*, 8(6): 598-600.
- Batt, C.A., Wagner, P., Wiedmann, M., Luo, J., Gilbert, R. (1994) Detection of bovine leukocyte adhesion deficiency by nonisotopic ligase chain reaction, *Animal Genetics*, 25: 95-98.
- Başaran, N. (1996) *Tıbbi Genetik*. (Altıncı baskı). İstanbul: Bilim Teknik Yayınevi, 49.

- Berglund, B., Persson, A., Stalhammar, H. (2004) Effects of complex vertebral malformation on fertility in Swedish Holstein cattle, *Acta Veterinaria Scandinavica*, 45: 161-165.
- Boehm, C.D. (1989) Use of polymerase chain reaction for diagnosis of inherited disorders, *Clinical Chemistry*, 35: 1843-1848.
- Botstein, D., White, R., Skolnick, M., Davis, R. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism, *American Journal Human Genetics*, 32: 314-331.
- Brush, P.J., Anderson, P.H., Gunning, R.F. (1987) Identification of factor XI deficiency in Holstein-Friesian cattle in Britain, *The Veterinary Record*, 121: 14-17.
- Chu, Q., Sun, D., Yu, Y., Zhang, Y., Zhang, Y. (2008) Identification of complex vertebral malformation carriers in Chinese Holstein, *Journal of the Veterinary Diagnostic Investigation*, 20: 228-230.
- Citek, J., Rehout, V., Hajkova, J., Pavkova, J. (2006) Monitoring of the genetic health of cattle in the Czech Republic, *Veterinary Medicine Czech Republic*, 51(6): 333-339.
- Clark, P., Bowden, D.K., Parry, B.W. (1997) Studies to detect carriers of haemophilia a in German Shepherd Dogs using diagnostic DNA polymorphism in the human factor VIII gene, *Veterinary Journal*, 153: 71-74.
- Craznik, U., Grzybowski, G., Kaminski, S., Prusak, B., Zabolewicz, T. (2007) Effectiveness of a program aimed at the elimination of BLAD-carrier bulls from Polish Holstein-Friesian cattle, *Journal of Applied Genetics*, 48: 375-377.
- Dawson, D.B. (1990) Use of nucleic acid in genetic test, *Clinical Chemistry*, 23: 279-285.

Duncan, R.B.Jr., Carrig, C.B., Agerholm, J.S., Bendixen, C. (2001) Complex vertebral malformation in a Holstein calf: report of a case in the USA, *Journal of the Veterinary Diagnostic Investigation*, 13: 333-336.

Erlich, H.A. (1989) *PCR Technology Principles and Applications for DNA Amplication*, Oxford: IRL Press at Oxford University Press.

Eydivandi, C., Amirinia, C., Jamah-Kasha, N.E., Chamani, M., Fayazi, J. (2011) Study of factor XI deficiency in Khuzestan cattle population of Iran, *African Journal of Biotechnology*, 10(4): 718-721.

Fesüs, L., Zsolnai, A., Anton, I., Barany, I., Bozo, S. (1999) BLAD genotypes and cow production traits in Hungarian Holstein, *Journal of the Animal Breeding Genetics*, 116: 169-174.

Gabor, M., Miluchova, M., Trakovicka, A., Riecka, Z., Candrak, J., Vavrisinova, K. (2012) Detection of complex vertebral malformation carriers in Slovak Holstein cattle by high resolution melting analysis, *Acta Veterinaria*, 62:239-248.

Gentry, P.A., Black, W.D. (1980) Prevalence and inheritance of factor XI (plasma thromboplastin antecedent) deficiency in cattle, *Journal of Dairy Science*, 63: 616-620.

Ghanem, M.E., Nishibori, M., Nakao, T., Nakatani, K., Akita, M. (2005) Factor XI mutation in a Holstein cow with repeat breeding in Japan, *The Journal of Veterinary Medical Science*, 67(7): 713-715.

Ghanem, M.E., Nakao, T., Nishibori, M. (2006) Deficiency of uridine monophosphate syntheses (DUMPS) and X-chromosome deletion in fetal mummification in cattle, *Animal Reproduction Science*, 91: 45-54.

Ghanem, M.E., Akita, M., Suzuki, T., Kasuga, A., Nishibori, M. (2008) Complex vertebral malformation in Holstein cows in Japan and its inheritance to crossbred F1 generation, *Animal Reproduction Science*, 103: 348-354.

Gilbert, R.O., Rebhun, W.C., Kim, C.A., Kehril, M.E., Schuster, D.E., Ackermann, M.R. (1993) Clinical manifestations of leukocyte adhesion deficiency in cattle: 14 cases (1977-1991), *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 202: 445-449.

Holştayn ırkı inek, (<https://www.toptancimgazetesi.com>) Kullanılan tarih: 05.04.2015

Holştayn ırkı boğa, (<https://www.bilgidiyari.tk>) Kullanılan tarih: 05.04.2015

Healy, P.J. (1992) Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD)-another genetic defect of Holstein/Friesians, *Australian Veterinary Journal*, 69: 190.

Healy, P.J., Dennis, J.A., Moules, J.F. (1995) Use of hair roots as a source of DNA for the detection of heterozygotes for recessive defects in cattle, *Australian Veterinary Journal*, 72: 392.

Hemati, B., Gharaie-Fathabad, S., Fazeli, M.H., Namvar, Z., Ranji, M. (2015) Investigation of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) and complex vertebral malformation (CVM) in a population of Iranian Holstein cows, *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 5(1): 69-72.

Hirano, T., Hirotsune, S., Thomsen, B., Horn, P., Panitz, F., Bendixen, A., Petersen, A.H., Holm, L.E., Nielsen, V.H., Agerholm, J.S., Arnbjerg, J., Bendixen, C. (2006) A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter causes complex vertebral malformation, *Genome Research*, 16: 97-105.

- Holmes, N.G., Shaw, S.C., Dickens, H.F., Coombes, L.M., Ryder, E.J., Littlewood, J.D., Bims, M.M. (1996) Von Willebrand's diseases in UK Dobermans: Possible correlation of a polymorphic DNA marker with diseases status, *Journal Small Animal Practice*, 37: 307-308.
- Janosa, A., Baranyai, B., Dohy, J. (1999) Comparison of milk production of the progeny of BLAD-carrier and healthy Holstein bulls in Hungary, *Acta Veterinaria Hungarica*, 47(3): 283-289.
- Jolly, R.D., Sutton, R.H., Smith, R.I.E., Palmer, D.N. (1997) Ceroid-lipofuscinosis in miniature Schnauzer Dogs, *Australian Veterinary Journal*, 75: 67.
- Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. (1997) *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Fifth Edition. London: Academic Press, pp: 36-37.
- Karşlı, T., Şahin, E., Argun Karşlı, B., Alkan, S., Balçioğlu, M.S. (2011) Identification of alleles for faktör XI (FXID) and uridine monophosphate sythase (DUMPS) deficiencies in Holstein cows reared in Antalya, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17(3), 503-505.
- Kehrli, M.E. Jr., Ackermann, M.R., Shuster, D.E., Van Der Maaten, M.J., Schmalstieg, F.C., Anderson, D.C., Hughes, B.J. (1992b) Animal model of human disease, bovine leukocyte adhesion deficiency,  $\beta$ 2 integrin deficiency in young Holstein cattle, *The American Journal of Pathology*, 1406: 1489-1492.
- Kehrli, M.E. Jr., Shuster, D.E., Ackermann, M.R. (1992a) Leukocyte adhesion deficiency among Holstein cattle, *The Cornell Veterinarian*, 82: 103-109.
- Khade, A.S., Doiphode, A.Y., Umrikar, U.D., Sawane, M.P., Pauer, V.D. (2014) Genotyping of the Holstein-Frisian crossbred cattle for CD18 gene using PCR-RFLP, *Veterinary World*, 7(5): 360-362.

- Kishimoto, T.K., Larson, R.S., Corbi, A.L., Dustin, M.L., Staunton, D.E., Springer, T.A. (1989) The leukocyte integrins, *Advances in Immunology*, 46: 149-182.
- Klug, W.S. ve Cummings, M.R. (2003) (Çeviri editor: Öner, C.) *Genetik Kavramlar*. (Altıncı baskı). Palme Yayıncılık. ISBN: 0-13-081626-4, 515-517.
- Korkmaz Agaoğlu, Ö., Agaoğlu, A.R., Saatçı, M. (2015) Estimating allele frequencies of some hereditary diseases in Holstein cattle reared in Burdur province, Turkey, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 39: 338-342.
- Kotikalapudi, R., Patel, R.K., Sunkara, P.S.S., Roy, A. (2013) Detection of silent homozygous polymorphism in exon 4 of SLC35A3 gene in a Holstein cattle carrier for complex vertebral malformation, *International Journal of Veterinary Science*, 2(2): 61-64.
- Kulaklı, G.N. ve Akyüz, B. (2011) Kayseri bölgesinde yetiştirilen Holştayn sığırlarında kompleks vertebral malformasyon hastalığı geninin allel frekanslarının belirlenmesi, *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 8(2): 69-74.
- Laponten, J.M., Lachance, S., Steffen, D.L. (2000) Tibial hemimelia meningocele and abdominal hernia in Shorthorn cattle, *Veterinary Pathology*, 37: 508-511.
- Li, J., Wang, H., Zhang, Y., Hou, M., Zhong, J., Zhang, Y. (2011) Identification of BLAD and Citrullinemia carriers in Chinese Holstein cattle, *Animal Science Papers and Reports*, 1: 37-42.
- Marron, B.M., Robinson, J.L., Gentry, P.A., Beaver, J.E. (2004) Identification of a mutation associated with factor XI deficiency in Holstein cattle, *Animal Genetics*, 35(6): 454-456.

- Meydan, H., Yıldız, M.A., Özdil, F., Gedik, Y., Özbeyaz, C. (2009) Identification of factor XI deficiency in Holstein cattle in Turkey, *Acta Veterinaria Scandinavica*, 51: 5.
- Meydan, H., Yıldız, M.A., Agerholm, J.S. (2010) Screening for bovine leukocyte adhesion deficiency, deficiency of uridine monophosphate synthase, complex vertebral malformation, bovine citrullinaemia, and factor XI deficiency in Holstein cows reared in Turkey, *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52: 56.
- Millar, P., Lauvergne, J.J., Dolling, C. (2000) *Mendelian Inheritance in Cattle*. The Netherlands, Wageningen: Wageningen Press, pp: 351-352.
- Miller, M., Dykes, D.D., Polesky, H.F. (1985) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nukleic Acid Research*, 16, 1215-1219.
- Mondal, K., Chakravarti, S., Ghosh, A.K., Kumar, S., Nayak, B., Nandi, S., Sarkar, U., Rajib Deb., De, A., Biswas, J. (2016) Novel identification of factor XI deficiency in Indian Sahiwal (*Bos indicus*) cattle, *Molecular Biology Reports*, 43: 213-219.
- Mukhopadhyaya, P.N., Jha, M., Muraleedharan, P., Gupta, R.R., Rathod, R.N., Mehta, H.H., Khoda, V.K. (2006) Simulation of the normal, carrier and affected controls for large-scale genotyping of cattle for factor XI deficiency, *Genetics and Molecular Research*, 5(2): 323-332.
- Mullis, K., (1983) Polymerase chain reaction, <http://www.karymullis.com/pcr.shtml/>  
Kullanılan tarih: 05.04.2015
- Muraleedharan, P., Khoda, V., Sven, G., Mukhopadhyaya, P.N., Manfred, S., Mehta, H.K. (1999) Incidence of hereditary citrullinemia and bovine leukocyte adhesion deficiency syndrome in Indian dairy cattle (*Bos Taurus*, *Bos Indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalus*) population, *Archives Animal Breeding* , 42: 347-352.

- Müeller, K.E., Rutten, V.P.M.G., Becker, C.K., Hoek, A., Bernadina, W.E., Wentink, G.H., Figdor, C.G. (1995) Allograft rejection in cattle with bovine leukocyte adhesion deficiency, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 48: 55-63.
- Nagahata, H., Kehrli, M.E. Jr., Murata H., Okada, H., Noda, H., Kociba, G.J. (1994) Neutrophil function and pathologic findings in Holstein calves with leukocyte adhesion deficiency, *American Journal of Veterinary Research*, 55: 40-48.
- Nagahata, H., Oota, H., Nitandai, A., Oikawa, S., Higuchi, H., Nakade, T., Kurosawa, T., Morita, M., Ogawa, H. (2002) Complex vertebral malformation in a stillborn Holstein calf in Japan, *The Journal of Veterinary Medical Science*, 64(12): 1107-1112.
- Nagahata, H., Nishiyama, T., Kanae, Y., Higuchi, H., Kawai, K., Endoh, D., Hayashi, M., Kurosawa, T. (2009) A retrospective survey of the prevalence of complex vertebral malformation carriers in 9 Holstein dairy herds in Hokkaido Japan, *The Journal of Veterinary Medical Science*, 71(6): 793-795.
- Nicholas, F.W. (1996) Introduction to Veterinary Genetics, *Oxford: Oxford University Press*, 157-159: 205-213.
- Olchowy, T.W.J., Bochsler, P.N., Welborn, M.G. (1994) Clinopathological findings in a Holstein calf with peripheral leukocytosis and leukocyte adhesion deficiency, *The Canadian Veterinary Journal*, 35: 242-243.
- Paiva, D.S., Fonseca, I., Pinto, I.S.B., Ianella, P., Campos, T.A., Caetano, A.R., Paiva, S.R., Silva, M.V.G.B., Martins, M.F. (2013) Incidence of bovine leukocyte adhesion deficiency, complex vertebral malformation, and deficiency of uridine-5-monophosphate synthase carriers in Brazilian Girolondo cattle, *Genetics and Molecular Research*, 12(3): 3186-3192.

- Patel, M., Patel, R.K., Singh, K.M., Rank, D.N., Thakur, M.C., Khan, A. (2011) Detection of genetic polymorphism in CD18 gene in cattle by PCR-RFLP, *Woyamba Journal of Animal Science*, 578: 110-111.
- Revell, S. (2001) Complex vertebral malformation in a Holstein calf in the UK, *The Veterinary Record*, 149: 659-660.
- Rezaee, A.R., Nassiry, M.R., Valizadeh, R., Tahmoorespour, M. (2008) Study of complex vertebral malformation disorder in Iranian Holstein bulls, *World Journal of Zoology*, 2(2): 36-39.
- Rotfhuizen, J., Ubbink, G.J., van Zon, P., Teske, E., van Den Ingh, T., Yuzbasiyan Gurkan, V. (1999) Diagnostic value of a microsatellite DNA marker for copper toxicosis in West-European Belington Terriers and incidence of the disease, *Animal Genetics*, 30: 190-194.
- Roy, A., Kotikalapudu, R., Patel, R.K., Anantaneni, R., Katragadda, S. (2012) New cases of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) carriers in Indian Holstein cattle, *International Journal of Veterinary Science*, 1(2): 80-82.
- Saberi, J., Hemati, B., Noshary, A. (2014) Studying the genetic defects of CVM in Holstein cows of Alborz province, *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, 3(12): 38-41.
- Sağlam, M., Aşti, R.N., Özer, A. (1997) *Genel Histoloji Ders Kitabı*, Beşinci Baskı. Ankara: Yorum Matbaacılık Sanayi, s: 220-222.
- Schwenger, B., Schöber, S., Simon, D. (1993) DUMPS cattle carry a point mutation in the uridine monophosphate synthase gene, *Genomics*, 16: 241-244.
- Schuster, D.E., Kehrlı, M.E. Ackermann, M.R., Gilbert, R.O. (1992) Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein

cattle, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 9225-9229.

Schütz, E., Scharfenstein, M., Brenig, B. (2008) Implication of complex vertebral malformation and bovine leukocyte adhesion deficiency DNA-based testing on disease frequency in Holstein population, *Journal of Dairy Science*, 91: 4854-4859.

Shin, E.K., Perryman, L.E., Meek, K. (1997) A kinase-negative mutation of DNA-PKcs in equine SCID results in defective coding and signal joint formation, *Journal Immunology*, 158: 3565-3569.

Sipes, K.M., Edens, H.A., Kehrli, M.E. Jr., Miettinen, H.M., Cutler, J.E., Jutila, M.A., Quinn, M.T. (1999) Analysis of surface antigen expression and host defence function in leukocytes from calves heterozygous or homozygous for bovine leukocyte adhesion deficiency, *American Journal of Veterinary Research*, 60: 1255-1261.

Steffen, D. (2001) CVM threatens Holstein herds, *Veterinary Practical News*, 42:36.

Şahin, E., Karşlı, T., Galiç, A., Balçioğlu, S. (2013) Identification of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) and bovine citrullinaemia (BC) alleles in Holstein cows reared in Antalya region, *Journal of Applied Animal Research*, 41(1): 56-60.

Tammen, I., Klippert, H., Kuczka, A., Treviranus, A., Pohlenz, J., Stöber, M., Simon, D., Harlitzius, B. (1996) An improved DNA test for bovine leukocyte adhesion deficiency, *Research in Veterinary Science*, 60: 218-221.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.

Temizkan, G. ve Arda, N. (2004) *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 54-117.

- Thomsen, B., Horn, P., Panitz, F., Bendixen, E., Petersen, A.H., Holm, L.E., Nielsen, V.H., Agerholm, J.S., Arnbjerg, J., Bendixen, C. (2006) A missence mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter causes complex vertebral malformation, *Genome Research*, 16: 97-105.
- Wang, X., Miller, A.B., Lepine, A.J., Scott, D.J., Mupy, K.E. (1999) Analysis of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for identifying genetics markers associated with canine hip dysplasia, *Journal Hereditary*, 90: 99-103.
- Wang, C., Tong, Q., Hu, X.Z., Yang, L.G., Zhong, X.Q., Yu, Y., Wu, J.J., Liu, W.J., Li, X., Hua, G.H., Zhao, H.Q., Zhang, S.J. (2011) Identification of complex vertebral malformation carriers in Holstein cattle in South China, *Genetics and Molecular Research*, 10(4): 2443-2448.
- Wang, S., Hao, H., Zhao, X., Zhu, H., Du, W., Wang, D., Liu, Y., Qin, T., Wang, Z. (2012) A rapid mismatch polymerase chain reaction assay to detect carriers of complex vertebral malformation in Holstein cattle, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(3): 568-571.
- White, B.A. (1993) *PCR Protocols: current methods and application*, Totowa, New Jersey: Human Press.
- Wood, S., Langlois, S. (1991) DNA typing in hereditary disease, *Journal Chromotography*, 569: 421-447.
- Yaşar, G. ve Akyüz, B. (2012) Kayseri civarında yetiştirilen Holştayn ineklerde kalıtsal Faktör XI yetmezliği geninin allel frekanslarının belirlenmesi, *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 9(1): 7-12.

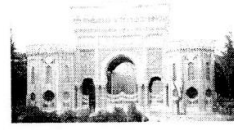
Yeh, F., Yang, R.C., Boyle, T. (2000) Popgene (v.1.32) Microsoft Windows-based freeware for Population Genetic Analysis. Retrieved from <http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene>.

Zhang, Y., Fan, X., Sun, D., Wang, Y., Yu, Y., Xie, Y., Zhang, S., Zhang, Y. (2012) A novel method for rapid and reliable detection of complex vertebral malformation and bovine leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle, *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 3:24.





T.C  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 2013/ 103

30 / 09 / 2013

Sayın: Doç. Dr. Hasret YARDİBİ  
İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi

**Karar No** :2013/ 103

**Başvuru** :09.09.2013

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen Yüksek Kimyager Neziha ÇAKMAK'a ait "Kocaeli, Sakarya ve Balıkesir İllerinde Holştayn Irkı Sığırlarda Sığır Lökosit Bağlanma Yetmezliği (BLAD), Faktör XI Eksikliği (FXID) ve Kompleks Vertebral Malformasyon (CVM) Hastalıkları Genlerinin Genotip ve Allel Frekanslarının Tespit Edilmesi" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Sığır
	Cinsiyeti	Erkek/Dişi
	Sayısı	300
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi		Ekim 2013/Ekim 2015

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ  
İÜ HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Mehmet Y. ALTIRIK  
İÜ HADYEK Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Pınar YAMANTÜRK ÇELİK  
Üye

Prof. Dr. Ufuk ÇAKATAY  
Üye

Doç. Dr. Alper OKYAR  
Üye

Yard. Doç. Dr. Altan ARMUTAK  
Üye

Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ  
Üye

Yard. Doç. Dr. Burak OLGUN  
Üye

Avukat Selma DEMİR  
Üye

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Neziha	<b>Soyadı</b>	Hacıhasanoğlu Çakmak
<b>Doğ.Yeri</b>	E.Cuma	<b>Doğ.Tar.</b>	18.06.1985
<b>Uyruğu</b>	T.C	<b>TC Kim No</b>	45448381052
<b>Email</b>	nhacıhasanoglu@mynet.com	<b>Tel</b>	05376938581

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>	İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya ABD	2016
<b>Yük.Lis.</b>	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya ABD	2011
<b>Lisans</b>	İ.Ü. Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü	2008
<b>Lise</b>	Vefa Lisesi	2003

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Stajyer	VETAŞ	2005-2005
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	orta	iyi	75	

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>ALES Puanı</b>	77	77	
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

**YAYINLAR**

Hacıhasanoğlu Çakmak, N., Yanardağ, R., 2013, Sıçanlarda Valproik Asid İle Oluşturulan Beyin Doku Hasarı ve Beyin Sialik Asid Düzeyleri Üzerine Edaravon'un Etkileri, II. Ulusal Glikobiyoloji Kongresi, PB-8, 38.

Hacıhasanoğlu Çakmak, N., Yanardağ, R., 2015, Edaravone, a free radical scavenger, protects liver against valproic acid induced toxicity, J. Serb. Chem. Soc. 79(0), 1-15.

Yardibi, H., Gürsel, F., Ateş, A., Akış, I., Hacıhasanoğlu, N., Oztabak, K., 2015, Polymorphism of the KAP 1.1., Kap 1.3., K33 genes in Chios, Kivircik, Awassi. Kafkas Üni. Vet. Fak. Derg. 21(4) 535-538.

Yanardağ, R., Bayrak, B.B., Sancar Bas, S., Hacıhasanoğlu Çakmak, N., Bolkent, S., 2015, Edaravone prevents kidney injury induced by valproic acid, Pathology and Laboratory Medicine: on the forefront of personalized medicine, 1055, 44.

**SERTİFİKALAR**

II International VETistanbul Group Congress Russia, 2015- Russia, St.Petersburg, 7-9 April 2015

İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, 10-21 Ekim 2011

Pera Medikal Bio-Tek ELX 808 Elisa Okuyucu Cihazı KC Programı Eğitimi, 11.11.2008

