



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**YILLIK AŞILAMANIN SENYÖR KÖPEKLERDE
KAYGI, BİLİŞSEL FONKSİYON BOZUKLUĞU VE
FEKAL MİKROBİYOTA ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Begüm SARAL

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Yasemin SALGIRLI DEMİRBAŞ**

**ANKARA
2023**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YILLIK AŞILAMANIN SENYÖR KÖPEKLERDE
KAYGI, BİLİŞSEL FONKSİYON BOZUKLUĞU VE
FEKAL MİKROBİYOTA ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Begüm SARAL

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Yasemin SALGIRLI DEMİRBAŞ

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
21L0239001 proje numarası ve Tübitak 1002 programı
21L0239001 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2023

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Yıllık Aşılamanın Senyör Köpeklerde Kaygı, Bilişsel Fonksiyon Bozukluğu ve Fekal Mikrobiyota Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Begüm Saral

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Fizyoloji Anabilim Dalında Begüm Saral tarafından hazırlanan
“Yıllık Aşılamanın Senyör Köpeklerde Kaygı, Bilişsel Fonksiyon Bozukluğu ve
Fekal Mikrobiyota Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZİ
olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Jüri Başkanı
İmza

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xii
Çizelgeler	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Doğal ve Kazanılmış İmmun Yanıt	1
1.1.1. Humoral ve Hücre Aracılı İmmunité	3
1.1.2. Lenfositler ve Alt Grupları	3
1.1.3. T Lenfositler	4
1.2. İmmunizasyon Tipleri	7
1.2.1. Pasif İmmunizasyon	7
1.2.2. Aktif İmmunizasyon	9
1.3. Aşı Adjuvanları	12
1.4. Köpeklerde İmmunizasyon	14
1.4.1. Köpeklerde Aşılama	16
1.4.2. Aşılamanın Olası Yan Etkileri	20
1.5. İmmun Sistem, Sinir Sistemi ve Mikrobiyota İlişkisi	21
1.5.1. Köpeklerde Sindirim Sistemi Mikrobiyotası	25
1.5.2. Uçucu Yağ Asitlerinin İntestinal Mikrobiyota Üzerine Etkileri	28
1.5.3. Bağırsak-Beyin Aksisi	31
1.6. Köpeklerde Yaşlanma	33
1.6.1. Köpeklerde Yaşlanmaya Bağlı Şekillenen Fiziksel Değişiklikler	34
1.6.1.1. Deri ve Tüy Sağlığında Şekillenen Değişiklikler	34
1.6.1.2. Vücut Kondisyonu ve Kiloda Şekillenen Değişiklikler	35
1.6.1.3. Adipokin Salgısı ve Kronik İnflamasyon	35
1.6.2. Köpeklerde Yaşla Birlikte Organ Sistemlerinde Şekilllenen Değişiklikler	36
1.6.2.1. İskelet ve Kas Sistemlerindeki Değişiklikler	36
1.6.2.2. Kardiyovasküler Sistemdeki Değişiklikler	37
1.6.2.3. Solunum Sistemindeki Değişiklikler	37
1.6.2.4. Üriner ve Renal Sistemdeki Değişiklikler	37
1.6.2.5. Endokrin Sistemdeki Değişiklikler	38
1.6.2.6. İmmun Sistemdeki Değişiklikler	38
1.6.3. İntestinal Mikrobiyotada Şekillenen Değişiklikler	38
1.6.4. Biliş ve Davranışsal Açıdan Şekillenen Değişiklikler	40
1.6.5. Yaşlı Köpeklerde Davranış Değişikliklerinin Nedenleri	40
1.6.5.1. Medikal Durumlar	41
1.6.5.2. Yaşa Bağlı Yaygın Olarak Gözlenen Davranış Değişiklikleri	41
1.6.5.2.1. Stresle İlişkili Davranışlar	41
1.6.5.2.2. Çoklu Faktörlerin Etkisi	42
1.6.5.2.3. Primer (Medikal Olmayan) Davranış Problemleri	42
1.6.6. Köpeklerde Bilişsel Fonksiyon Bozukluğu	43

1.6.7. Yaşlı Köpeklerde Ağrının Davranışsal Değişiklikler İle İlişkisi	45
1.7. Çalışmanın Amacı	46
2. GEREÇ VE YÖNTEM	47
2.1. Gereç	47
2.1.1. Örneklem Seçimi ve Demografik Bilgi	47
2.2. Yöntem	48
2.2.1. Davranışsal Değerlendirme	48
2.2.1.1. Nesne Seçim Testi	48
2.2.1.2. KONG Testi	53
2.2.1.3. Mini C-BARQ Analizi	54
2.2.1.4. Bilişsel Fonksiyon Bozukluğu Değerlendirme Anketleri	55
2.2.1.5. Helsinki Kronik Ağrı İndeksi	56
2.2.1.6. Yaşam Kalitesi (QoL) Ölçeği	57
2.2.2. Hematolojik Analizer	57
2.2.2.1. Tam Kan ve Serbest T4 (FT4) Analizi	58
2.2.2.2. Serum BDNF Analizi	58
2.2.2.3. Flow Sitometri Analizi	60
2.2.3. Dışkı Numunelerinin Toplanması ve Analizi	62
2.2.4. İstatistiksel Analiz	68
3. BULGULAR	70
3.1. Demografik Bilgi	70
3.2. Davranışsal Değerlendirmeler	71
3.2.1. CBARQ Analizleri	71
3.2.2. Bilişsel Fonksiyon Bozukluğuna İlişkin Analizler	72
3.2.3. Pati Tercihinin Belirlenmesi	74
3.2.4. Ağrı Değerlendirmesi	74
3.2.5. QoL Değerlendirmesi	75
3.2.6. Video Analizleri	77
3.3. Fizyolojik Parametler	81
3.3.1. Hemogram Analizleri	81
3.3.2. BDNF Analizleri	81
3.4. Dışkı ile İlgili Analizler	82
3.5. Bağışıklık ile İlgili Analizler	106
4. TARTIŞMA	108
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	139
ÖZET	141
SUMMARY	142
KAYNAKLAR	143
EKLER	168
Ek-1 Etik Kurul Kararı	168
Ek-2 Hasta Sahipleri Tarafından Doldurulan Yaşam Kalitesi Ölçeği Skorlarının Grafikleri	169
Ek-3 Kısa Zincirli Yağ Asidi Bileşimini Gösteren Örnek Sonuçlar	180
Ek-4 Hemogram ve FT4 Sonuçları	185
Ek-5 Köpek Sahiplerine Gönderilen Anket Formu	186

ÖNSÖZ

Doktora tez projesi kapsamında yaşlı köpeklere hayat boyu uygulanan aşılamının kaygı, bilişsel fonksiyon ve fekal mikrobiyota üzerine etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Ülkemizde paraziter enfestasyon, viral ve bakteriyel enfeksiyonların görülme sıklığının oldukça fazla olması başta kedi ve köpekler olmak üzere evcil hayvanlara düzenli aralıklarla aşılmasını gerektirmektedir. Yıllık olarak uygulanan aşılama protokollerinin senyör köpeklerin özellikle bilişsel süreçlerine ve intestinal sağlıkları üzerinde nasıl etki gösterdiği bilinmemektedir.

Aynı zamanda yaşlı hayvanlarda akut ve kronik ağrı durumunun belirlenmesi davranış problemlerinin doğru şekilde teşhis edilmesinde önemli bir role sahiptir. Yaşla birlikte artan anksiyetenin ağrı durumu ile şiddetlenmesi evcil hayvanların refahı açısından büyük risk teşkil etmektedir. Senyör köpeklerde davranışsal ve çevresel modifikasyonların herhangi bir hastalık durumu olmaksızın yapılması oldukça önemlidir. Bu noktada veteriner hekimlerin ve hasta sahiplerinin iş birliği içerisinde evcil hayvanın ihtiyaçlarını ve zorlandığı noktaları dikkatli bir şekilde tespit etmesi önerilmektedir. Bilişsel fonksiyonu desteklemek amacıyla senyör köpeklerde puzzle, koku matları gibi mental aktiviteyi artıran interaktif oyun kurgularının gerçekleştirilmesinin, hayvan sahiplerinin köpekleriyle sosyal etkileşimlerinin pozitif ve doğru şekilde korumasının önemli olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda ev ortamında güvenli bir alanın yaratılması, bu alanın feromon içeren difüzörler ile desteklenmesi senyör köpeklerde kaygıyı azaltmaya yardımcı olabilmektedir. Yaşlılık ile artan kaygı seviyesini azaltmak için günlük rutinlerin oluşturulması, köpeğin yaşantısına dahil olacak yeni olay/kişi//rutin/nesnelerin aşamalı bir şekilde tanıtılması ve bu noktada hasta sahiplerinin sabırlı olmaları yönünde uyarılmaları önem taşımaktadır.

Senyör köpeklerin kullandığı mama içeriğinin hem sağlıklı mikrobiyota profili hem de bilişsel fonksiyonun desteklenmesi açısından uygun olmasına dikkat edilmelidir. Antioksidan ve probiyotik takviyelerinin kullanımı, aşılama protokollerinin optimizasyonu gibi proinflatuar süreçleri azaltmak veya

yavaşlatmak için gerekli stratejilerin uygulanması ve doğru ağırlı yönetimlerinin gerçekleştirilmesi senyör köpeklerde uzun ve sağlıklı bir yaşlılık süreci için önemli görünmektedir. Uzun zamandır birlikte yaşadığımız, birçok evrimsel süreci paylaştığımız bu canlıları anlamaya çalışmak ve onların yaşam kalitesini iyileştirmek için çaba göstermek özellikle biz veteriner hekimlerin en büyük sorumluluklarından birisidir.

Doktora sürecimin en başından sonuna kadar desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen ve ne zaman karamsarlığa kapılsam sabırla beni tekrar motive etmeye çalışan çok kıymetli tez danışmanım, hocam Prof. Dr. Yasemin SALGIRLI DEMİRBAŞ'a hem hayata dair hem de akademik bilgi ve tecrübelerinden yararlanma şansını bana vermiş olduğu için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım ve doktora sürecimde kendilerinden çok şey öğrenme fırsatı bulduğum, bilgi birikimi ve desteklerini hep hissettiğim tez izleme komitemde yer alan Prof. Dr. Hakan ÖZTÜRK ve Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'a ne kadar yoğun olurlarsa olsunlar zaman ayırdıkları ve bu süreci tamamlamamda gösterdikleri katkı için teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecimde beni yalnız bırakmayan Araş. Gör. Durmuş ATILGAN'a katkıları ve zaman ayırıp bana bu süreçte her zaman destek olduğu için çok teşekkür ederim. İmmunolojik verilerin analizi noktasında beni aydınlatan ve yardımını hiç esirgemeyen Araş. Gör. Nazlı FİLAZİ'ye, uçucu yağ asitleri analizi konusunda destekleri ve yardımları için Saad ADAM ve Gürsel GÜR'e, doktora sürecimde yardım ve destekleri için Araş. Gör. Dr. Etkin ŞAFAK ve Melis ÜNLER'e teşekkürlerimi sunarım.

Klinisyenlik noktasında her zaman bilgi birikimi ve tecrübesini benimle paylaşan, onlardan çok şey öğrenme fırsatı bulduğum ve ne zaman yardıma ihtiyaç duysam koşup gelen, doktora tezimde de bana çok destek olan çok sevgili Burcu KURT ve Cem KURT'a teşekkürlerimi sunarım. Her koşulda anlayışlı, sabırlı ve hep yanımda olduğunu bildiğim canım arkadaşım Pelin AYVAZOĞLU'na çok teşekkür

ederim. Hayatımda olduğu için kendimi çok şanslı hissettiğim, hayatı bazen mücadele bazen macera içinde birlikte deneyimlediğimiz, keşfettiğimiz yol arkadaşım ve meslektaşım Deniz ADIAY’a bu süreçte bana göstermiş olduğu sabır ve anlayış için çok teşekkür ederim.

Biricik annem Zerrin SARAL’a hayatımın her anında ne olursa olsun yanımda olduğu için ve ayrıca tez yazım sürecimde bir an bile yanımdan ayrılmadığı için binlerce kez teşekkür ederim. Hayatımda yaşadığım endişeleri, umutsuzlukları bana unutturan, neden bu mesleği yaptığımı bana her zaman hatırlatan canım Miya’ya ve başta İbrahim olmak üzere tüm Biyofilya kedilerine çok ama çok teşekkür ederim.



SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
5-HT	5-hidroksitriptamin
AAHA	American Animal Hospital Association
AD	Alzheimer hastalığı
APC	Antijen sunan hücre
BA	Safra asiti
BBB	Kan beyin bariyeri
BCR	B hücre antijen reseptörü
CAV-1	Köpek adenovirüs tip-1
CAV-2	Köpek adenovirüs tip-2
CD	Diferansiyasyon kümesi
CDV	Köpek distemper virüsü
CFU	Koloni oluşturan birim
CNS	Merkezi sinir sistemi
CPV-2	Köpek parvovirüs tip-2
CRF	Kortikotropin serbestleştirici faktör
DAMP	Hasar ile ilişkili moleküler patern
DOI	Minimum bağışıklık süresi
ENS	Enterik sinir sistemi
GABA	Gama aminobütirik asit
GBA	Bağırsak-beyin aksisi
GF	Germ Free
GI	Gastrointestinal
HPA	Hipotalamus hipofiz adrenal aksisi
IBD	Yangısal Bağırsak Hastalığı
IEL	İntraepiteliyal T lenfositler
IFN	İnterferon
Ig	İmmunglobulin
IL	İnterlökin

ILC	Doğal lenfoid hücre
ISCOMs	İmmun stimüle edici kompleksler
LPS	Lipopolisakkarit
MAMPs	Mikrobiyal ilişkili moleküler paternler
MBL	Mannoz-bağlayıcı lektin
MDA	Maternal kaynaklı antikör
MHC	Majör Histokompatibilite Kompleksi
MPLA	Monofosforil lipit A
NKC	Doğal öldürücü hücreler
NOD	Nükleotit oligomerizasyon domaini
PAMP	Patojen ile ilişkili moleküler patern
pH	Power of Hydrogen
PRR	Patern Tanıma Reseptörü
pTreg	Periferik Treg hücresi
SCFA	Kısa zincirli yağ asidi
SFB	Segmentli ipliksi bakteri
T helper	Yardımcı T hücresi
Tc	Sitotoksik T hücresi
TCR	T hücre antijen reseptörü
TGF	Dönüştürücü Büyüme Faktörü
TJ	Tight junction
TLRs	Toll-benzeri reseptörler
Treg	Regülatör T hücresi
tTreg	Doğal Treg hücreleri
VGG	Aşılama Yönergesi Grubu
WSAVA	Dünya Küçük Hayvan Veteriner Hekimler Derneği
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
SPF	Spesifik patojen free
T3	Triiyodotironin
CDD	Köpeklerde bilişsel fonksiyon bozukluğu
A β	Amiloid Beta
MCI	Hafif bilişsel bozukluk

BDNF	Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
MDD	Majör depresif bozukluk
CBARQ	Canine Behavioral Assessment and Research Questionnaire
CCDR	Canine Cognitive Dysfunction Rating Scale
HCPI	Helsinki Kronik Ağrı İndeksi
QoL	Yaşam Kalitesi
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FT4	Serbest T4
CLIA	Kemilüminesans İmmunassay
rpm	Dakikadaki devir sayısı
bp	Baz çifti
OTU	Operasyonel taksonomik ünite
MANOVA	Multivariate analysis of variance
PCA	Temel Bileşen Analizi
GWAS	Genom çapında ilişkilendirme çalışması
PS1	Presenilin 1
PS2	Presenilin 2
DNMP	Delayed non-matching to position task
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
ORO	Gözlemci tarafından bildirilen sonuç ölçütleri
NGS	Yeni nesil sekanslama
ITS	Internal transcribed spacer
OSS	Otonom sinir sistemi
SSS	Sempatik sinir sistemi
fMRI	Fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme
GLP-1	Glukagon benzeri peptid-1
EEC	Enteroendokrin hücre
ACTH	Adrenokortikotropik hormon

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	CD4 + T Hücrelerinin Sınıflandırılması	5
Şekil 1.2.	Adjuvanların Çalışma Mekanizması. DAMP'lar, hasar-ilişili moleküler paternler; NOD'lar, nükleotit oligomerizasyon domainleri; PAMP'lar, patojen-ilişkili moleküler paternler; TLR'ler, Toll-like reseptörler	13
Şekil 1.3.	Köpeklerde Temel ve Temel Olmayan Aşılar	17
Şekil 1.4.	Köpeklerde yaşla birlikte ana bakteri filalarında şekillenen göreceli çokluk yüzdeleri	27
Şekil 2.1.	Nesne Seçim Testinin Optimizasyon Çalışması	50
Şekil 2.2.	Testin yapıldığı ortamının şeması	50
Şekil 2.3.	Solomon Coder Ekranı (a: video oynatıcı, b: konfigürasyon tablosu, c: davranışsal patern butonları)	53
Şekil 2.4.	Ev Ortamında KONG testi	54
Şekil 2.5.	DISHAA Anketi	55
Şekil 2.6.	CCDRS Anketi	56
Şekil 2.7.	Helsinki Kronik Ağrı Skalası	57
Şekil 2.8.	16S rRNA Gen Bölgesi ve Değişken (Variable) Bölgeleri	66
Şekil 3.1.	Köpeklerin CBARQ Skor Dağılımları	71
Şekil 3.2.	CBARQ skorları açısından gruplar arasındaki farklar	72
Şekil 3.3.	Gruplara göre CCDR skor ortalamaları	73
Şekil 3.4.	Gruplara göre DISHAA skor ortalamaları	73
Şekil 3.5.	Köpeklerin gruplara göre pati tercihleri	74
Şekil 3.6.	Köpeklerin ortalama kronik ağrı indeksleri	75
Şekil 3.7.	Çalışmaya katılan köpeklerin genel performans skorları (%)	77
Şekil 3.8.	Nesne seçim testi aşamalarında köpeklerin genel performans skoru	78
Şekil 3.9.	Çalışmaya katılan köpeklerin genel performans, son aşama ve toplam skorları	79

Şekil 3.10.	Toplam skor ve toplam zamanı arasındaki ilişki	80
Şekil 3.11.	Toplam skoru 5 ve 0 olan köpeklerin aktivitelerinin karşılaştırılması	81
Şekil 3.12.	Grupların BDNF değerleri (ng/dL)	82
Şekil 3.13.	Çalışmaya katılan tüm köpeklerin UYA miktarlarının karşılaştırılması	83
Şekil 3.14.	Gruplara göre asetat miktarı	84
Şekil 3.15.	Gruplara göre propiyonat miktarı	84
Şekil 3.16.	Gruplara göre bütirat miktarı	85
Şekil 3.17.	Gruplara göre izobütirat miktarı	85
Şekil 3.18.	Gruplara göre valerat miktarı	86
Şekil 3.19.	Gruplara göre izovalerat miktarı	86
Şekil 3.20.	Gruplara göre tUYA miktarı	87
Şekil 3.21.	Dışkıdaki Asetat/Propiyonat/Bütirat Oranları	87
Şekil 3.22.	Tanımlanan taksonomik basamaklar	88
Şekil 3.23.	Örnek başına elde edilen ve cins seviyesinde tanımlanan ve tanımlanamayan okuma	90
Şekil 3.24.	Tüm köpeklerde görülen 5 ana filumun görece oranları (%)	91
Şekil 3.25.	1. (en az 3 yıl önce aşılانmış) ve 2. (her yıl düzenli olarak aşılانmış) grupta en fazla görülen 5 ana filumun görece yüzdeleri	92
Şekil 3.26.	En yüksek oranda görülen filumların dağılımları	93
Şekil 3.27.	Tüm köpeklerde en fazla görülen 5 sınıfın görece oranları (%)	94
Şekil 3.28.	En yüksek oranda görülen sınıfların dağılımları	95
Şekil 3.29.	Tüm köpeklerde en fazla görülen 5 takımın görece oranları (%)	96
Şekil 3.30.	En yüksek oranda görülen takımların dağılımları	97
Şekil 3.31.	Tüm köpeklerde en fazla görülen 5 familyanın görece oranları (%)	98
Şekil 3.32.	En yüksek oranda görülen familyaların dağılımları	99
Şekil 3.33.	Tüm köpeklerde en fazla görülen 5 cinsin görece oranları (%)	100
Şekil 3.34.	En yüksek oranda görülen cinslerin dağılımları	101

Şekil 3.35.	Tüm köpeklerde en fazla görülen 5 türün görece oranları (%)	102
Şekil 3.36.	En yüksek oranda görülen türlerin dağılımları	103
Şekil 3.37.	Örneklerin PCA sonrası PC1 ve PC2 düzlemindeki dağılımları	104
Şekil 3.38.	Grup 1 ve Grup 2'yi oluşturan köpeklerin Th1, Th2 ve Th1:Th2 değerlerinin karşılaştırılması (%)	106



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Doğal ve Kazanılmış Bağışıklığın Başlıca Özellikleri	2
Çizelge 1.2.	Köpeklerde Aşı Tiplerinin Sınıflandırılması	10
Çizelge 1.3.	Veteriner Aşılarında Yaygın Olarak Kullanılan Adjuvanlar	14
Çizelge 1.4.	Köpeklerde Aşı Antijenlerinin Tahmini DOI Süreleri ve Etkinlikleri	18
Çizelge 2.1.	Çalışmaya Katılan Köpeklerin Demografik Bilgileri	47
Çizelge 2.2.	Konfigürasyon Tablosu	51
Çizelge 3.1.	Köpeklerin demografik bilgileri	70
Çizelge 3.2.	Gram Kuru Madde İçindeki UYA Miktarları	83
Çizelge 3.3.	Tüm numunelerde en yüksek oranda görülen 20 cins	89
Çizelge 3.4.	Örneklem grubunu oluşturan köpeklerin Shannon ve Simpson İndeksleri ve cins sayıları.	105
Çizelge 3.5.	Grup 1 ve Grup 2 arasında Th1 ve Th2 yüzdelerinin karşılaştırılması	107

1. GİRİŞ

Aşılama protokollerinin doğru ve düzenli bir şekilde uygulanması bütün canlılar için hayati bir öneme sahiptir. Enfeksiyöz hastalıkların eradikasyonu, çeşitli hastalıkların mortalite ve morbidite oranlarını azaltmak, zoonoz hastalıkların önüne geçmek amacıyla aşılama programlarının yürütülmesi daha sağlıklı bir popülasyon için en güvenilir profilaksi yöntemlerinden birisidir. Bu çalışma ile senyör köpeklerde aşılarda tekrarlanma sıklığının merkezi sinir sistemi, bağışıklık sistemi ve sindirim sistemi üzerine etkileri araştırılmıştır.

1.1. Doğal ve Kazanılmış İmmun Yanıt

Doğal (non-spesifik) ve kazanılmış (spesifik) bağışıklık; immün sistemin temel bileşenlerini oluşturmaktadır. Doğal bağışıklık sistemi özellikle patojen mikroorganizmaların daha çok temas halinde olduğu deri, solunum sistemi, gastrointestinal sistem, ürogenital sistem, meme bezi ve oküler mukoza gibi anatomik bölgelerde aktiftir. Bu sistemlerde bulunan çeşitli fiziksel bariyerler (anatomik ve fizyolojik) vücudun ilk koruma hattını oluşturmaktadır. Anatomik bariyerler yardımı ile doğal bağışıklık sisteminin savunma mekanizması başlamaktadır. Anatomik ve fizyolojik mekanizmalara ek olarak patern tanıma reseptörleri (PRR) doğal bağışıklık yanıtına katkı sağlamaktadır PRR'ler (MBL-mannoz bağlayıcı lektin, pulmonar sürfektan proteini, C-reaktif protein, TLRs-Toll-benzeri reseptörler, C-tip lektin, NOD-Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon domaini gibi) membran proteinleri olarak sınıflandırılırlar ve doğal bağışıklık sistemi hücrelerinin tamamının membranında bulunabilirler. Bu reseptörler herhangi bir patojene veya antijene karşı spesifik değildir ancak antijenlere karşı çok hızlı bir şekilde yanıt sağlarlar ve sitokin salınımını uyaran patojen ilişkili moleküler paternleri (PAMPs (LPS-Lipopolisakkarit, peptidoglikan, lipoproteinler, hipometil DNA, çift sarmal DNA ve flagellin) tanırırlar. PAMP'ların PRR'ler tarafından tanınması komplement aktivasyonuna, opsonizasyona, sitokin salınımına ve fagosit aktivasyonuna neden olmaktadır Doğal bağışıklık yanıtı, epitelyal bariyerler, yerleşik fagositik hücreler,

özelleşmiş lenfoid hücreler, polireaktif antikorlar ve komplement sistem ile sağlanmaktadır. Doğal bağışıklık sisteminin inflamasyon ve diğer önemli bileşenleri vücut için önemli ölçüde koruma sağlasa da tek başına yeterli olamamaktadır (Day ve Shultz, 2014; Clem, 2011; Tizard, 2004).

Kazanılmış bağışıklık yanıtının bileşenleri lenfoid hücrelerdir. Bunlar; kazanılmış bağışıklığı yöneten ve düzenleyen T lenfositler ve bu hücrelerden salgılanan sitokinler ve kemokin haberci proteinleri ile geç-evre plazma hücrelerine dönüşerek antikor üreten ve salgılayan B lenfositlerdir (Goldsby ve ark., 2003). Doğal ve kazanılmış bağışıklığın başlıca özellikleri Çizelge 1.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Doğal ve Kazanılmış Bağışıklığın Başlıca Özellikleri (Benjamini ve Leskowitz, 1991).

	Doğal Bağışıklık	Kazanılmış Bağışıklık
Özellikler	Non-spesifik antijen	Spesifik antijen
	Hızlı yanıt (dakikadan saate kadar değişen)	Yavaş yanıt (günler)
	İmmunolojik bellek oluşumu yok	İmmunolojik bellek oluşumu var
İmmun Komponentler	Doğal bariyerler (Deri, mukoz membranlar gibi)	Lenfositler
	Fagositler ve doğal öldürücü hücreler (NKC)	Antijen tanıyıcı moleküller (B ve T hücre reseptörleri)
	Çözünbilir mediatörler (Örneğin; komplement)	Salgılanan moleküller (Örneğin; antikorlar)
	Patern tanıma molekülleri	

Kazanılmış bağışıklık sisteminin gelişimi doğal bağışıklık sistemine göre daha yavaş olmaktadır ve doğal bağışıklık sisteminin aksine patojenik ajana karşı spesifik olarak şekillenmektedir. İmmunolojik bellek oluşumu kazanılmış bağışıklık sisteminin bir diğer önemli özelliğidir. Bu sayede canlı, aynı antijen ile tekrar karşılaştığında immün sistem çok daha hızlı ve efektif bir sekonder immün yanıt oluşumuna izin vermektedir. Bu olay klinik tıpta aşı uygulamasının temelini oluşturmaktadır (Tizard, 2004).

1.1.1. Humoral ve Hücre Aracılı İmmünite

Kazanılmış bağışıklık yanıtı geçmişten beri “B hücre aracılı veya humoral immun yanıt” ve T hücre aracılı veya hücreyel immun yanıt” olmak üzere iki ayrı sınıfta incelenmektedir (Benjamini ve Leskowitz, 1991).

B lenfositler ve antikorlar humoral immunitenin veya antikor-aracılı immunitenin bileşenleri iken (Day ve Shultz, 2014; Tizard, 2004) T lenfositler hücre-aracılı immunitite veya sellüler immunitenin bileşenlerini oluşturmaktadır. Humoral immunitite ekstrasellüler patojen ajanlara ve toksinlere karşı fonksiyon göstermektedir. T-hücrelerinin aksine, B-hücreleri doğal formlarında antijenleri tanıyabilirler bu da antijenin antijen sunan hücre (APC) tarafından işlenmesini ve daha sonra yardımcı T hücresi (T helper) tarafından sunulmasını gerektirmeden antijenleri tanıyabilecekleri anlamına gelmektedir (Goldsby ve ark., 2003). Bu antijenler T-bağımsız antijenler olarak isimlendirilir çünkü B lenfosit aktivasyonu için T-hücre aktivasyonu gerekli değildir. T-bağımsız antijenlere örnek olarak lipopolisakkarit, dekstran ve bakteriyel polimerik flagellin verilebilir. Bu yolla oluşan immun yanıt ve immonolojik bellek yardımcı T hücresi aktivasyonuna göre daha zayıf şekillenmektedir. Yardımcı T hücresi aktivasyonu ile birlikte B hücrelerinin aktivasyonu çok daha etkili immun yanıt ve immonolojik bellek oluşumuna neden olmaktadır. Bu uzun süreli ve efektif immun yanıt oluşumu immunizasyonun temel amacıdır. Hücre-aracılı immunitite intrasellüler veya endojen patojen ajanlara karşı fonksiyon göstermektedir (Day ve Shultz, 2014; Tizard, 2004; Tizard, 2018).

1.1.2. Lenfositler ve Alt Grupları

Genel olarak lenfositler üç ana sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar, doğuştan gelen bağışıklıkta rol oynayan doğuştan gelen lenfoid hücreler, kazanılmış bağışıklığı düzenleyen ve hücre aracılı bağışıklık yanıtından sorumlu olan T hücreler ve antikor üretiminden sorumlu olan B hücrelerdir. Bu ana türler içinde, her biri farklı özelliklere ve işlevlere sahip birçok alt popülasyon vardır (Tizard, 2018).

T ve B lenfositlerin yüzey membranında bir dizi benzersiz yüzey molekülü bulunmaktadır. T hücreleri, hücreye antijen spesifikliği kazandıran T hücre antijen reseptörü (TCR) ile tanımlanırken B hücreleri B hücre antijen reseptörü (BCR) olarak tanımlanır. Hem TCR hem de BCR, birçok farklı protein zincirinden oluşan kompleks yapılardır. Bu protein zincirlerinden bazıları antijen moleküllerine bağlanırken, diğerleri sinyal iletimi için kullanılır. TCR zincirleri tarafından farklılaştırılan iki T hücre popülasyonu vardır. Biri çift α ve β peptit zincirlerini (TCR α/β) kullanırken ve diğeri çift γ ve δ zincirlerini (TCR γ/δ) kullanmaktadır. B hücrelerinin alt popülasyonları, BCR'lerinde beş farklı ağır zincirden (γ , μ , α , ϵ ve δ) birini kullanmaktadır. BCR'ler, B hücrelerinden büyük miktarlarda doku sıvısına ve kana geçerek antikor olarak adlandırılmaları bakımından da TCR'lerden farklıdır. Bu nedenle antikorlar aslında çözünebilir BCR'lerdir (Tizard, 2018).

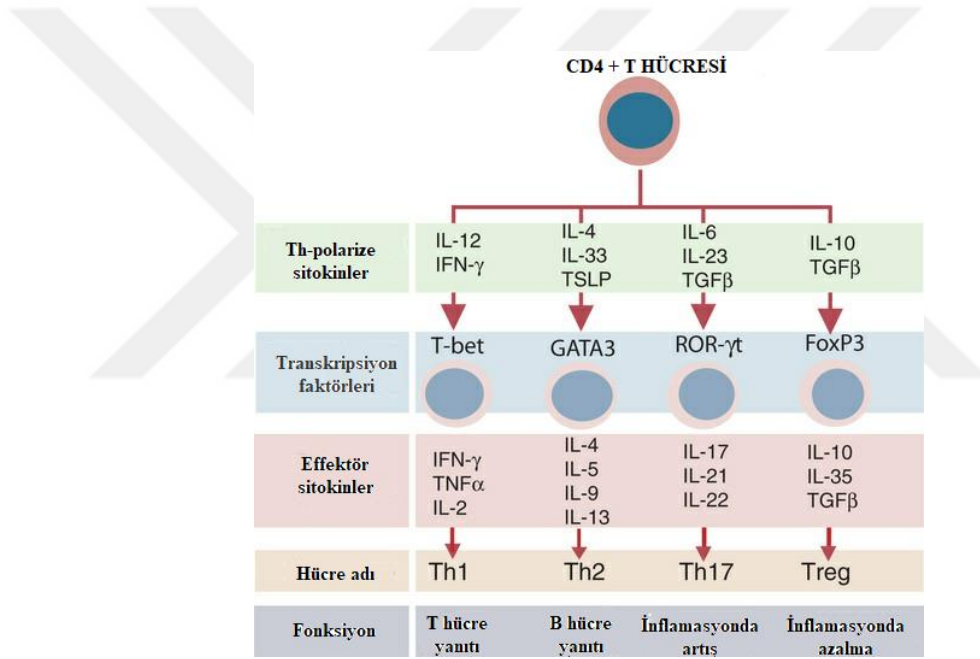
T hücreleriyle sınırlı diğerk moleküller arasında CD3, CD4 ve CD8 bulunurken B hücreleriyle sınırlı moleküller arasında CD21 ve yüzey Fc ve CR1 reseptörleri yer almaktadır. Bu moleküllerin dışında farklı lökositler tarafından eksprese edilen ve spesifik olarak tanımlanan çok sayıda membran zar molekülü mevcuttur. Bu moleküller, CD (diferansiyasyon kümesi) numaralandırma sistemi ile uygun şekilde sınıflandırılmaktadır (Day ve Shultz, 2014).

CD3, TCR'deki sinyal ileten protein kümesine verilen ortak isimdir. CD3 bu nedenle tüm T hücrelerinde bulunmaktadır. Bir başka protein olan CD4 ise, yalnızca yardımcı T hücrelerinde bulunmaktadır. Üçüncü bir protein olan CD8 ise, yalnızca anormal hücrelere saldıran ve onları öldüren sitotoksik T hücrelerinde (Tc) eksprese edilmektedir (Tizard, 2018).

1.1.3. T Lenfositler

T lenfositler timusta olgunlaştıktan sonra kan dolaşımına salınır. İmmun yanıt temel olarak T-hücre popülasyonu ile düzenlenir. İmmun yanıtı uyaranlar yardımcı T hücresi olarak isimlendirilirken, immün yanıtı inhibe edenler regülatör T hücresi

(Treg) olarak isimlendirilir. Yardımcı T lenfositler ekzojen bir antijene karşı immün yanıtı başlatan hücrelerdir. En yaygın ve iyi bilinen T lenfosit tipleri; CD4 + T hücreleri ve CD8 + T hücreleri'dir (sitotoksik T hücreleri veya katil T hücreleri olarak da isimlendirilir). CD4 + T hücreleri, antikor aracılı immünite için ve B hücrelerinin ekstrasellüler patojenlerin kontrolü için gereklidir. CD4 + T hücreleri gelişip farklılaştıkça dört ana CD4 + T hücre popülasyonu ortaya çıkmaktadır (Şekil 1.1). Bu hücreler Th1, Th2, Th 17 ve regülatör T hücreleri olmak üzere dört alt sınıfa ayrılmaktadır. Bu hücreler APC yüzeyinde antijenik peptid-Majör Histokompatibilite Kompleksi (MHC) sınıf II'ye yanıt veren bir $\alpha\beta$ TCR taşıyan CD4+ T hücresidir ve her biri salgıladıkları sitokinler ile ayırt edilmektedir (Day ve Shultz, 2014).



Şekil 1.1. CD4 + T Hücrelerinin Sınıflandırılması (Tizard, 2018).

Th1 hücreler, gecikmiş tip hipersensitivite reaksiyonu ve makrofaj aktivasyonu gibi hücre aracılı immünitenin geliştirilmesine yardımcı olurken; Th2 hücreler antikor aracılı immünitenin geliştirilmesine yardımcı olur ve bu yanıt bazı otoimmün hastalıkları baskılar, toksinleri nötralize eder ve enfeksiyon ve yaralanma sonrası yara ve doku onarımını düzenler. Dikkatli bir şekilde düzenlenmediğinde, tip 2 yanıtlar, zarar verici alerjik tepkileri tetikleyebilmektedir (Day ve Shultz, 2014; Goldsby ve ark., 2003; Tizard, 2004; Tizard, 2018).

Th1 hücreleri interleokin (IL) 12 ile uyarılırlar ve hücrel bağışıklık yanıtına katılan pro-inflamatuar sitokinler olan IL-2 ve İnterferon γ (IFN- γ)'yı üretirler. Th2 hücreleri IL-1 tarafından uyarılırlar ve anti-inflamatuar sitokinler olan IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 IL-10 ve IL-13'ü üretirler ve genellikle humoral bağışıklık yanıtına katılırlar (Pereira ve ark., 2019).

Th17 hücrelerinin gelişimi IL-23 tarafından başlatılır. IL-23, ROR- γ t adı verilen bir transkripsiyon faktörünün üretimini tetikler. Th17 hücrelerinin gelişimi daha sonra Dönüştürücü Büyüme Faktörü (TGF)- β , IL-6 ve IL-21 tarafından desteklenir. Bu moleküller, Th17 hücrelerinin IL-17A, IL-17F, IL-21 ve IL-22 üretimini destekler. Bu hücreler, çeşitli infeksiyöz, otoimmün ve neoplastik hastalıklarda inflamasyona aracılık eder ve özellikle nötrofil alımını artırmada etkilidir. Th17 hücreleri, mantarlara karşı geliştirilen immün yanıtta önemli bir role sahiptir. Bazı durumlarda Th17 hücreleri, IFN- γ üreten Th1 hücrelerine dönüşebilir. Aynı şekilde, inflamasyon çözüldüğünde Treg'lere farklılaşabilirler. Th17 ve Treg hücreleri arasındaki denge, immün yanıt ve inflamasyon sırasında homeostazın sürdürülmesi için kritik bir öneme sahiptir. Th17 aktivitesinin normalden çok daha fazla olması, kronik inflamatuvar hastalıkların gelişmesine yol açabilir. Th17 hücreleri tarafından üretilen bir sitokin olan IL-17'nin, astım, lupus ve romatoid artrit gibi immünolojik hastalıkların oluşum mekanizmasında önemli bir rolü olduğu gösterilmektedir (Day ve Shultz, 2014).

Treg'ler fenotipik olarak CD4 ve CD25'in (IL-2 reseptörünün α zinciri) ekspresyonu ve Foxp3 transkripsiyon faktörü kullanımı ile karakterizedir. Doğal Treg hücreleri (tTreg'ler) timustan köken alırken, periferik Treg hücreleri (pTreg'ler) ikincil lenfoid organlarda, özellikle bağırsaklarda üretilir. Bağırsaklar, pTreg gelişiminin ana bölgesidir ve bağırsaklardaki özelleşmiş dendritik hücreler, TGF- β , IL-2 ve A vitamininin metaboliti olan retinoik asidin bir kombinasyonunu kullanan yollar aracılığıyla bu gelişimi destekler. Retinoik asit, bağırsaklardaki bakteriyel mikrobiyota tarafından üretilir ve normal T hücre işlevi için gereklidir. Treg hücreleri ayrıca IL-10 ve IL-35 gibi supresif sitokinleri üretir. Sonuç olarak, Treg hücreleri hem Th1 hem de Th2 hücrelerinin yanıtlarını baskılar ve antijen yokluğunda

uygunsuz T hücre aktivasyonunu önler. Treg hücreleri ve Th2 hücreleri arasındaki denge birçok inflamatuvar ve alerjik hastalığın düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Day ve Shultz, 2014; Tizard, 2018).

CD8 + T hücreleri hücre aracılı immunité için ve intrasellüler patojenlerin kontrolü için gereklidir. B-hücrelerinin aksine, T-hücreleri sadece APC'ler tarafından işlenen ve sunulan antijeni tanıyabilir. Antijen işleme olgusu 2 tiptir. Birincisi, intrasellüler antijenlerin MHC I proteinleri ile birlikte APC'lerin yüzeyine bağlanmasını içermektedir. Bu durum viral antijenler ve tümör hücreleri ile ortaya çıkmaktadır. İkinci antijen işleme tipi ise, ekstrasellüler antijenlerin MHC II proteinleri ile birlikte APC'lerin yüzeyine bağlanmasını içermektedir. Bu durum ise bakteriyel ve parazitik ajanlar ile ortaya çıkmaktadır. T hücresi, APC'ler tarafından aktive edildikten sonra, CD4 hücresi veya CD8 hücresi olmasına bağlı olarak işlevlerini yerine getirmeye başlar. CD4 hücrelerinin CD8 hücrelerine oranı, lenfosit fonksiyonunu tahmin etmek için kullanılabilir. Yükselmiş CD4 hücre oranı yardımcı T hücrelerinin çoğunlukta olmasından dolayı lenfosit reaktivitesinin arttığı anlamına gelirken CD8 hücre oranının yükselmesi lenfosit reaktivitesinin deprese olduğu anlamına gelmektedir (Day ve Shultz, 2014; Goldsby ve ark., 2003; Tizard, 2004).

1.2. İmmünizasyon Tipleri

1.2.1. Pasif İmmünizasyon

Pasif immünizasyon, önceden oluşturulmuş antikorların immünize olmayan canlıya aktarılması ile gerçekleşmektedir. Canlı daha sonra bu önceden oluşturulmuş antikorların varlığı nedeniyle belirli bir organizmaya veya toksine karşı geçici bir bağışıklık geliştirmektedir (Clem, 2011). Pasif olarak transfer edilen bu antikorlar anında koruma sağlamakta fakat yavaş katabolize olmaktadır (Tizard, 2004). Pasif immünizasyon, doğal veya yapay olarak gerçekleşebilmektedir (Day ve Shultz, 2014).

Doğal pasif immünizasyonun en güzel örneği, maternal antikorların plasentadan fetüse geçmesi ve bu antikorların kolostrum ve süt yoluyla yavruya aktarılmasıdır (Clem, 2011; Goldsby ve ark., 2003). Maternal immünglobulinlerin (diğer proteinler, lenfositler ve sitokinlerle birlikte) bu transferi, yeni doğan yavruya kendi endojen immünitesini aktive edene kadar geçici immun koruma sağlamaktadır. Kolostral immünglobulin, insan ve diğer yenidoğan primatlar için gerekli değildir, çünkü bu türlerde bulunan hemokorial plasantasyon, maternal immünglobulinin korionik epitel boyunca transferine izin vermekte, böylece neonataller neredeyse yetişkinlerdekine benzer serum immunoglobulin (Ig) G konsantrasyonları ile doğmaktadır. İnsan ve primatların aksine, köpeklerde ve kedilerde, endoteliyokorial plasantasyondaki maternal endotelyum bariyeri, yalnızca az miktarda Ig G transferine izin vermektedir. Bu nedenle, kedi ve köpek yavruları, yetişkinlerde bulunan serum immunoglobulin seviyesinin yalnızca %5'i veya daha azı ile dünyaya gelmektedir. Kolostrum bu nedenle Ig G ve Ig A açısından zengindir ve az miktarda Ig M ve Ig E içermektedir. Çoğu evcil memelinin kolostrumunda baskın olan immunoglobulin, toplam antikor içeriğinin %65-%90'ını oluşturan IgG'dir (Day ve Shultz, 2014; Tizard, 2018).

Köpek kolostrumunda üç sınıf immünoglobulin (Ig G, Ig M ve Ig A) bulunurken (%60-75 Ig G baskın), IgE ise saptanmamıştır. Kolostrumdaki Ig G başlangıçta 15-30 g/L civarındadır ancak çok hızlı bir şekilde düşüş göstererek 7. günde 5 g/L'ye ve 14. günde 1 g/L'nin altına düştüğü gösterilmektedir. Bu nedenle sütteki Ig G konsantrasyonu, kolostrumdakinden 20 kat daha azdır. Ig A, kolostral Ig'nin %16-40'ını oluştursa da, daha sonra sütte en yaygın görülen immunoglobulin haline gelmektedir (Schäfer-Somi ve ark., 2005; Schäfer-Somi ve ark., 2016).

Yapay pasif immunizasyona örnek olarak ise tetanoz antitoksin kullanımı veya yılan, eklembacaklı veya böcek ısırıklarına karşı geliştirilen antivenom çeşitleri verilebilir. Bu antiserumlar geleneksel olarak at veya koyun gibi büyük bir hayvan türünde oluşturulmaktadır (Day ve Shultz, 2014). Serum örnekleri, hiperimmunize hayvanlardan elde edilmekte ve bu serumlardan immunoglobulinler elde edilmektedir. Bu immunoglobulinler, heterolog türlere enjekte edildiğinde antijenik

özellik göstermekte ve antitoksinlerin tekrar tekrar uygulanması, gelecekte alıcı canlıyı aşırı duyarlılık reaksiyonu için duyarlı hale getirebilmektedir. Tekrarlanan dozlarda at immunoglobulinin başka tür canlıya uygulanması Ig E üretimine ve anafilaksiye neden olabilmektedir. Bu nedenle, pasif immunizasyon yöntemlerinin kullanımına dikkatli bir şekilde karar verilmeli ve mümkün olan en az sayıda uygulama yapılmalıdır (Day ve Shultz, 2014; Tizard, 2018).

Monoklonal antikorların kullanımı, hayvanlar için başka bir pasif koruma kaynağıdır. Ancak esas olarak bu antikorlar fare-fare hibridomaları ile elde edilmektedir ve dolayısıyla fare immunoglobulinleri olarak tanınmaktadır. Bu nedenle, diğer türlere enjekte edildiğinde antijenik özellik göstermektedirler. Monoklonal antikorlar, insanlarda ve hayvanlarda inflamatuvar hastalıklar ve kanser tedavisi için giderek daha fazla kullanılmaktadır. Monoklonal antikorların özgün olması, onları hedefe yönelik tedavi ve araştırma için güçlü birer araç haline getirmektedir (Tizard, 2018).

1.2.2. Aktif İmmunizasyon

Aktif immunizasyon, bağışık olmayan canlının patojenik bir ajana maruz kalmasıyla ortaya çıkmaktadır. Canlının immun sistemi daha sonra bu ajana karşı immunité geliştirme sürecine başlamaktadır. Pasif immunizasyonun aksine, aktif immunizasyon tipik olarak canlının immun sisteminin uyarılması nedeniyle uzun süreli bağışıklık sağlamaktadır (Clem, 2011).

Aktif immunizasyonun dezavantajı, kazanılmış bağışıklık yanıtlarında olduğu gibi, korumanın hemen sağlanamamasıdır. Ancak, bir kez oluştuktan sonra, bağışıklık uzun ömürlüdür ve yeniden uyarılabilme kabiliyetine sahiptir. Pasif immunizasyon ile karşılaştırıldığında aktif immunizasyonun pek çok avantajı mevcuttur. Bunlar arasında uzun süreli koruma süresi ve tekrarlanan antijen enjeksiyonları veya enfeksiyona maruz kalma yoluyla bu koruyucu yanıtın hatırlanması ve arttırılması yer almaktadır. Aktif immunizasyon doğal bir şekilde

hastalığı atlatarak veya aşılama aracılığı ile gerçekleştirilmektedir. Aşılama, patojen ajanın nonpatojenik fakat yine de immünojenik bileşenlerinin inokulasyonu yolu ile doğal olarak kazanılmış bağışıklığın gelişimini taklit etmeyi amaçlamaktadır. "Aşı" terimi (Latince "vacca", inek anlamına gelmektedir), insanları çiçek hastalığı virüsüne karşı korumak amacıyla insanların sığır çiçeği virüsü ile aşılmasını tanımlamak için ilk olarak Edward Jenner tarafından icat edilmiştir. Aktif immunizasyon için ideal aşı; tutarlı bir formülasyona sahip olmalı, özel saklama koşullarına ihtiyaç duymadan stabil olmalı, raf ömrü uzun olmalı, enfeksiyondan korunmayı sağlamak için en uygun immun yanıtı indükleyebilmeli, antijen spesifik T ve B lenfositleri aktive etmek için hedef organizmadan bir dizi immunodominant epitop içermeli, uzun süreli ve güçlü immun yanıt sağlamalı, immunolojik belleği uyarma yeteneği olmalı, yan etkisi olmamalıdır. Modern aşılar, belirli bir infeksiyöz ajanı en iyi şekilde elimine eden optimum T-hücre ve sitokin yanıtını replike etmeye çalışmaktadır (Day ve Shultz, 2014; Meeusen ve ark., 2007; Tizard, 2004).

Günümüzde veteriner hekimlik alanında yaygın olarak kullanılan aşılardan büyük çoğunluğunu canlı attenüe aşılar, ölü/inaktif aşılar, rekombinant aşılar ve toksoid aşılar (Çizelge 1.2) oluşturmaktadır (Jorge ve Dellagostin; 2017; Mcvey ve Shi, 2010).

Çizelge 1.2. Köpeklerde Aşı Tiplerinin Sınıflandırılması (Ellis ve ark., 2022).

Tip	Alternatif İsim	Tanım	Örnek
Attenüe	- Canlı - Modifiye Canlı - Canlı Attenüe	- Uzun süreli bağışıklık; hem hücresel hem de humoral bağışıklığın indüksiyonu - Hem enfeksiyonu hem de hastalığı önleme olasılığı daha yüksek - Bazı aşılar, attenüe/modifiye virüsün geçici viral saçılımına neden olabilir - Virülans şekillenme ihtimali teorik olarak mümkün, ancak uygun şekilde test edilmiş ve ruhsatlandırılmış aşılar da olası değil - Saklama koşulları ve uygulama şekli (sulandırdıktan hemen sonra uygulanmalı)	- Çoğu köpek distemper virus ve parainfluenza virus aşıları - Tüm köpek parvovirüs ve adenovirüs-2 aşıları

Çizelge 1.2. Devam. Köpeklerde Aşı Tiplerinin Sınıflandırılması (Ellis ve ark., 2022).

İnaktive	• Ölü	• Hastalığa neden olmayan stabil ürünler • Attenüe aşılarla göre daha az immünojenik ve daha kısa bağışıklık süresi • Yeterli bağışıklığı sağlamak için genellikle adjuvan gerektirir; daha sık uygulama gerektirebilir • Olumsuz reaksiyonlarla daha fazla ilişkili olabilir • Enfeksiyona karşı koruma sağlamayabilir (bunun yerine hastalığa karşı koruma sağlar)	• Köpeklerde kuduz ve influenza aşısı • Tam hücre bakterin aşıları - Köpeklerde bazı Lyme aşıları - Köpeklerde bazı leptospirozis aşıları • Parenteral Bordetella bronşiseptika aşısı
Rekombinant	• Subunit • Polisakkarit • Konjugat • Şimerik • Viral-vektör	• Tek başına veya diğer antijenlerle kombinasyon halinde bir virüs veya bakteriyel plazmide veya tek bir proteine eklenen patojenin genini kullanır • İmmünojenite ve rapel dozların sıklığı açısından önemli değişkenlik gösterir	• Canarypox virus vektörlü köpek distemper aşısı • Köpeklerde bazı Lyme aşıları • Plazmid ile eksprese edilen veya tasarlanmış antijenler
Toksoid		• Organizmanın kendisinden ziyade organizmanın ürettiği toksine karşı bağışıklık oluşturur • Aşı türleri arasında genellikle en kısa bağışıklık süresi	• Batı elmas sırtlı çingiraklı yılan (<i>Crotalus atrox</i>) toksoid aşısı

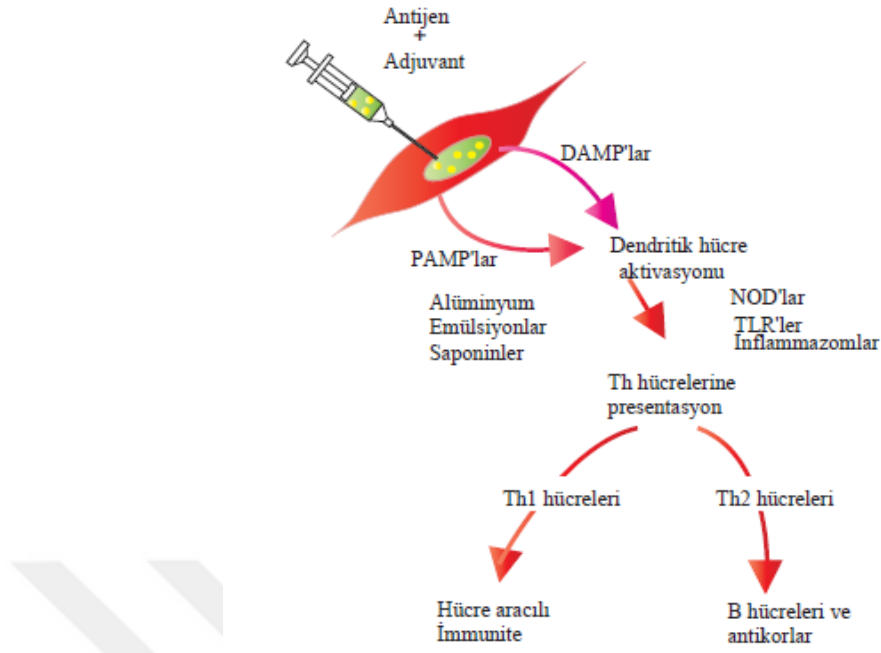
Canlı attenüe aşılar oldukça etkilidir çünkü hem hücresel hem de humoral immun yanıtı uyarmaktadırlar (da Costa ve ark., 2015; Rizzi ve ark., 2012). Ancak bu aşılarla bulunan canlı attenüe mikroorganizmanın yeniden virülant bir karakter kazanması, lokal inflamasyona yol açması ve otoimmün yanıtı artırma olasılığının bulunması olumsuz taraflarındandır (Jorge ve Dellagostin, 2017; Shimoji ve ark., 2002; Unnikrishnan ve ark., 2012). Ölü / inaktif aşılar canlı aşılarla göre daha güvenlidir; ancak bu şekilde uzun süre koruma sağlayamazlar. İnaktif aşılarla kıyasla, canlı attenüe aşıların üretilmesi daha kolaydır, formülasyonlarında adjuvanların kullanılması gerekmemektedir (van Gelder ve Makoschey, 2012).

1.3. Aşı Adjuvanları

Aşılamamın amacı, koruyucu bağışıklığın indüklenmesidir ve bazı aşılarda bu, adjuvanların eklenmesiyle arttırılabilmektedir (Awate ve ark., 2013). Özellikle ölü/inaktif mikroorganizmaları veya yüksek oranda purifiye antijenleri içeren aşıların, etkinliğini en üst düzeye çıkarmak için, aşılar adjuvan adı verilen maddelerin eklenmesi yaygın bir uygulamadır (Tizard, 2018). Adjuvanlar (Latince “adjuvare”, yardım eden, güçlendiren anlamında) ilk olarak Gaston Ramon tarafından “antijenden daha güçlü bir bağışıklık yanıtı üreten spesifik bir antijenle kombinasyon halinde kullanılan maddeler” olarak tanımlanmıştır (Ramon, 1924).

Adjuvanlar, vücudun aşırıya karşı oluşturduğu yanıtın hızını veya büyüklüğünü artırabilir, enjekte edilen antijen miktarında veya uygulanan doz sayısında azalmaya olanak sağlayabilir, uygun Th1 veya Th2 yanıtını sağlamaya yardımcı olabilir, hücre aracılı immun yanıtı uyarabilir ve çözünebilir antijenlere karşı uzun süreli bellek oluşumu sağlanmasında önemli rol oynayabilmektedir (Tizard, 2019).

Adjuvanlar, kazanılmış bağışıklık yanıtlarını optimize etmek ve aşı antijenlerinin APC’ler tarafından, esas olarak dendritik hücreler aracılığıyla alınmasını sağlamak için gerekli olan zorunlu doğal immun yanıtı tetikler. Bunu iki şekilde sağlayabilirler. Birincisi, dendritik hücre fonksiyonu ve antijen sunumu için uyarıcı görevi görerek doğal immun yanıtı tetiklerler. Buna alternatif olarak da antijeni dendritik hücrenin işlemesi ve antijen sunumu için optimize edilmiş bir formda sağlarlar. Doğal immun yanıt, PRR’ler mikrobiyal invazyonu ve doku hasarını algıladığında tetiklenir. Hasar ile ilişkili moleküler paternler (DAMP’ler) veya patojen ile ilişkili moleküler paternler (PAMP’ler), PRR’ler aracılığıyla doğal immun yanıt tepkilerini tetikler. Dendritik hücrelerde PRR’lerin ve diğer hücrel reseptörlerin aktivasyonu, sitokin salınımını tetikler. Bu sitokinler, yardımcı T hücre yanıtını destekler ve bu durumda B ve T hücreleri aktive olarak kazanılmış immun yanıt desteklenir (Şekil 1.2). Kısaca özetlemek gerekirse adjuvanlar, T veya B hücrelerine antijen sunumunu arttırmak için dendritik hücreler üzerinden doğal immun yanıt tepkilerini tetiklemektedir (Tizard, 2019).



Şekil 1.2. Adjuvanların Çalışma Mekanizması. *DAMP'lar, hasar-ilişili moleküler paternler; NOD'lar, nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon domainleri; PAMP'lar, patojen-ilişkili moleküler paternler; TLR'ler, Toll-like reseptörler (Tizard, 2019).*

Veteriner hekimliği alanında genellikle aşılamada kullanılan adjuvanlar arasında; mineral tuzları (alüminyum) (Li ve ark., 2014), emülsiyonlar (Miles ve ark., 2005; Peter ve ark., 2001), biyoçözünür polimerik mikropartiküller ve nanopartiküller bulunmaktadır. Bunlara ek olarak bir dizi alternatif adjuvan immun sistem üzerindeki doğrudan etkileri nedeniyle “immun güçlendirici” olarak tanımlanmıştır (Ott ve ark., 2000). Bunlara örnek olarak monofosforil lipit A (MPL) (Garçon ve ark., 2011) gibi TLR agonistleri, saponinler ve bakteriyel ekzotoksinler (Marchioro ve ark., 2013) verilebilir. Adjuvanlar doğal immun yanıtın stimülasyonu ve bunun sonucu olarak kazanılmış immunitede antijen işleme aşamasının geliştirilmesine bağlı olarak DAMP, PAMP ve partikülat olmak üzere üç ana sınıfta incelenebilir. DAMP tipi adjuvanlara örnek olarak alüminyum, emülsiyonlar ve saponinler verilebilirken PAMP tipi adjuvanlara örnek olarak TLR ligandları, lipopolisakkaritler, MPLA, mikobakteriyel bileşikler verilebilir. Partikülat sınıfındaki adjuvanlar ise nanopartiküller, lipozomlar ve immun stimüle edici kompleksleri (ISCOMs) içermektedir (Tizard, 2019).

İmmün sistemi kuvvetli bir şekilde aktive eden emülsiyon tipi adjuvanların aksine, alüminyum tuzları, Th1 veya hücre aracılı bağışıklık aktivasyonunu önemli ölçüde indükleyemez. Bununla birlikte bu adjuvanlar, aşılanmış canlıda yüksek antikor titrelerine yol açan etkili bir Th2 indükleyicisi olarak görev almaktadır (Jorge ve Dellagostin, 2017). Yapılan deneysel çalışmalar alüminyum tuzlarının sitotoksik T lenfositlerini indükleyemediğini göstermiştir (Newman ve ark., 1992). Tercih edilmesi gereken adjuvan, hem Th1 hem de Th2 yanıtlarını desteklemelidir ancak kullanılan çoğu adjuvan Th2 ağırlıklı bir yanıt geliştirmektedir (Hjertner ve ark., 2018).

Çizelge 1.3. Veteriner Aşılarında Yaygın Olarak Kullanılan Adjuvanlar (Tizard, 2019).

Adjuvan (Ticari İsim)	Adjuvan Sınıfı	İçeriği
- Emülsijen-D MVP Laboratories - MF59 (Novartis) - ISCOMs - ISCOMATRIX	- Su içinde yağ emülsiyonu - Su içinde yağ emülsiyonu - Nanopartikül - Kombinasyon	- Mineral yağlar ve dimetildioktadesil amonyum bromür - Skualen, polisorbitat 80, sorbitan trioleat, sitrat tamponu - Kolesterol, fosfolipid, saponin - Saponin, kolesterol, dipalmitoil fosfatidil kolin
- MetaStim Fort Dodge - Havlogen Merck Animal Health	- Yağ emülsiyonu - Polimer	- Emülgatörlü yağ bileşimi - Karbopol
- AS04 Glaxo Smith Kline - AS03 Glaxo Smith Kline - TS6, Boeringer Ingelheim	- Alüminyum ile adsorbe edilmiş TLR agonisti - Su içinde yağ emülsiyonu - Su içinde yağ emülsiyonu	- Alüminyum, monofosforil lipid A (MPLA) - Skualen, polisorbitat 80, α tokoferol - Mineral yağları ve çok sayıda lipofilik ve hidrofilik surfaktan

1.4. Köpeklerde İmmünizasyon

Neonatal dönem (doğumdan sonraki 21. güne kadar) oldukça risklidir, çünkü doğan yavruların yaklaşık %10-30'u genellikle sepsisemi nedeniyle yaşamın ilk üç günü yaşamını yitirmektedir (Nelson ve Couto, 2009; Pereira ve ark., 2019). Köpeklerdeki endotelioyokoriyal plasantasyon tipi, immünitinin fetüse transferini

sınırlamaktadır. Bu nedenle, yeni doğan yavru köpekler neredeyse agamaglobulinemiktir ve doğumda 0,3 g/L Ig G serum seviyelerine sahipken, yetişkin köpeklerde bu değer yaklaşık 8-25 g/L'dir (Bouchard ve ark., 1992; Pereira ve ark., 2019; Poffenbarger ve ark., 1991; Stoffel ve ark., 2000). Bu nedenle daha önce bahsedildiği gibi, maternal kaynaklı antikorların kolostrum yoluyla pasif transferi, yeni doğan yavruların hayatta kalması için temel faktördür (Chastant-Maillard ve Aggouni, 2017; Heddle ve Rowley, 1975; Pereira ve ark., 2019; Ricks ve ark., 1970; Schäfer-Somi ve ark., 2005).

İntestinal Ig absorpsiyonu ilk dört saat içinde optimize edilmektedir, ardından doğumdan 16-24 saat sonra bağırsak bariyeri kapanana kadar azalmaktadır (Freyburger ve ark., 2012). Bağırsak bariyerinin kapanması, intestinal hücrelerin olgunlaşması ve intestinal mikrofloranın oluşmasıyla ilişkili görünmektedir (Chappuis, 1998). Kolostrum, sistemik bağışıklığı korumayı sağlamanın yanı sıra diğer türlerde olduğu gibi köpeklerde de farklı immun bileşikleri içermektedir. Enterik patojenlerin nötralizasyonuna katılan Ig A dışında, lizozim ve laktoferrin gibi kolostrumun diğer nonspesifik bileşiklerinin önemsiz olduğu düşünülmektedir (Chastant-Maillard ve Aggouni, 2017; Handl ve ark., 2009). Kolostrum alımı aynı zamanda, köpeklerde doğumdan sonraki ilk 24 saat içinde meydana gelen değişikliklerle gastrointestinal sistemin maturasyonuna katkı sağlamaktadır (Pereira ve ark., 2019).

Maternal olarak aktarılan distemper ve köpeklerde enfeksiyöz hepatit Ig G için bildirilen yarı ömür, yavru köpeklerde yaklaşık sekiz gündür (Carmichael ve ark., 1962; Chappuis, 1998) ve genellikle, distemper ve köpek parvovirüsüne karşı pasif olarak edinilen antikorlar, sırasıyla yaklaşık olarak 10-12. ve 15. haftalarda önemsiz seviyelere düşmektedir (Chappuis, 1998).

Hızlı büyüyen ırkların antikorlarının yavaş büyüyen ırklara kıyasla daha hızlı ortadan kalkmasıyla köpeklerde büyüme hızının maternal kaynaklı antikorların (MDA) ortadan kalkma kinetiğine katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür ve hızlı

büyüyen ırkların antikorları yavaş büyüyen ırklara göre daha hızlı bir şekilde düşüş göstermiştir (Chappuis, 1995; Chappuis, 1998; Pereira ve ark., 2019).

Köpek ve kedi yavrularına erken dönemde yapılan aşılamanın birçoğunun etkinliği maternal antikorlar tarafından engellenmektedir. Düşük MDA titresine sahip köpek yavruları daha erken yaşta enfeksiyonlara karşı savunmasız olabilirken (ve aşılamaya karşı yanıt verebilirken), MDA titresini yüksek yavrular aşılamaya ≥ 12 haftalık yaşa kadar cevap verememektedirler (Mila ve ark., 2015; Pereira ve ark., 2019; Reynolds ve Johnson, 1970).

1.4.1. Köpeklerde Aşılanma

AAHA (American Animal Hospital Association), mevcut verilere dayanarak aşıları temel (core) ve temel olmayan (non-core) olmak üzere iki kategoriye ayırmıştır. Temel aşılar, aşılamamak için özel bir tıbbi neden olmadıkça, köpeklerin yaşam şekillerine bakılmaksızın tüm köpekler için önerilen aşılar olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1.3) (Ellis ve ark., 2022).

Köpekler için geliştirilen temel aşılar arasında, köpek distemper virüsü (CDV), köpek adenovirüs tip-2 (CAV-2) ve köpek parvovirüs tip-2 (CPV-2) ve kuduz aşısı bulunmaktadır. Dünyada kuduz enfeksiyonunun endemik olduğu bir coğrafi bölgede hem evcil hayvan hem de insan popülasyonunun korunması için bu aşılara karşı yapılan aşılanmanın rutin olarak yapılan temel aşı sınıfı altında olması gerekmektedir. Birçok ülkede, kuduz aşısı yasal bir gerekliliktir ve genellikle uluslararası evcil hayvan seyahati için de gereklidir. Temel olmayan aşılar, bazı köpekler için yaşam şekli, coğrafi konum ve o enfeksiyona maruz kalma riskine göre önerilen aşılar. Köpeklerde leptospirosis aşısı, bordetella aşısı, Lyme aşısı, influenza aşısı ve batı elmas sırtlı çingiraklı yılanı aşısı temel olmayan aşı sınıfında kabul edilmektedir (Day ve ark., 2016; Ellis ve ark., 2022).

Aşılar bu şekilde sınıflandırılırsalar da her bir aşının veteriner hekim tarafından kullanımının objektif olması, kapsamlı bir risk değerlendirmesine dayanması ve aşı kullanımına ilişkin kendi mesleki kararını bilinçli bir şekilde vermesi gerektiği vurgulanmaktadır (Tizard, 2019).

TEMEL AŞILAR: Özel bir medikal sebep olmadıkça tüm köpekler için önerilir.			
ANTİJEN	İLK AŞILAMA UYGULAMASI		TEKRAR AŞILAMA UYGULAMASI
	≤16 Haftalık Yaş	>16 Haftalık Yaş	
Distemper Adenovirus Parvovirus +/-Parainfluenza	6-16 haftalık yaşta, 2-4 hafta arayla en az 3 doz aşı kombinasyonu	2-4 hafta arayla 2 doz aşı kombinasyonu	- İlk aşılama serisinde yapılan son doz aşırı takip eden 1 yıl içinde tek doz aşı kombinasyonu - Sonraki rapel/tekrar aşıları 3 yıl ara ile uygulanır
Kuduz	Yasalar ile belirlenmektedir		

TEMEL OLMAYAN AŞILAR: Yaşam tarzı, coğrafi konum ve enfeksiyona maruz kalma riskine göre önerilir.			
ANTİJEN	İLK AŞILAMA UYGULAMASI		TEKRAR AŞILAMA UYGULAMASI
	≤16 Haftalık Yaş	>16 Haftalık Yaş	
Leptospira (maktif) 4- serovar	12 haftalık yaşta başlayarak 2-4 hafta arayla iki doz	Yaşa bakılmaksızın 2-4 hafta arayla iki doz	- İlk aşılama serisinde yapılan son doz aşırı takip eden 1 yıl içinde tek doz - Rapel/tekrar aşıları 1 yıl ara ile uygulanır
Borrelia burgdorferi (canine Lyme disease)	2-4 hafta arayla iki doz	Yaşa bakılmaksızın 2-4 hafta arayla iki doz	- İlk aşılama serisinde yapılan son doz aşırı takip eden 1 yıl içinde tek doz - Rapel/tekrar aşıları 1 yıl ara ile uygulanır
Bordetella bronchiseptica & canine parainfluenza virus	Enfeksiyona maruz kalma riski taşıyan köpekler için tek doz intranasal aşı endikedir		Rapel/tekrar aşıları 1 yıl ara ile uygulanır
Bordetella bronchiseptica	Parenteral: 2-4 hafta arayla iki doz Intranasal: Tek doz intranasal olarak uygulanır Oral: Bukkal bölgeye tek doz uygulanır		Rapel/tekrar aşıları 1 yıl ara ile uygulanır
Canine influenza virus-H3N8/H3N2	2-4 hafta arayla iki doz		- İlk aşılama serisinde yapılan son doz aşırı takip eden 1 yıl içinde tek doz - Rapel/tekrar aşıları 1 yıl ara ile uygulanır
Crotalus atrox (Western diamondback rattlesnake)	Doz gerekliliği ve uygulama sıklığı, vücut ağırlığına ve enfeksiyona maruz kalma riskine bağlı olarak değişir.		

BİLİNMEYEN AŞI GEÇMİŞİ VE TARİHİ GEÇMİŞ AŞILAR	
Temel ve Temel Olmayan Aşılar	Bağışıklık durumu veya aşılama geçmişi bilinmeyen köpeklerde aşılamamanın yararları risklerinden çok daha fazladır. Tarihi geçmiş aşılar için, aşı üreticilerine danışılması gerekmektedir. Kural: Şüpheye düştüğünüzde aşı yapın.
Kuduz	Yerel yasalara uyulmalı ve gerektiğinde veteriner hekime danışılmalı.

Şekil 1.3. Köpeklerde Temel ve Temel Olmayan Aşılar (Ellis ve ark., 2022).

Aşıların uygulama sıklıkları minimum bağışıklık süresine (duration of immunity; DOI) göre belirlenmektedir. Yakın geçmişte temel aşıların çoğunun minimum 1 yıllık koruma sürelerine sahip oldukları ve bu nedenle aşılamamanın her yıl tekrarlanması önerilmekteydi. Son yıllarda, söz konusu aşıların çoğunun minimum 3 yıl boyunca koruma sağladığı belirlenmiş olup, bu aşılar genellikle 3 yıllık DOI için lisanslandırılmışlardır. 3 yıllık bir lisans süresi temel aşılar için minimum DOI'yi oluşturmaktadır ve çoğu temel aşı, aşılanan çoğu hayvanı yaşam boyu olmasa bile önemli ölçüde bu süreden daha uzun bir süre korumaktadır (Çizelge 1.4) (Day ve ark., 2016).

Çizelge 1.4. Köpeklerde Aşı Antijenlerinin Tahmini DOI Süreleri ve Etkinlikleri (Paul ve ark., 2003).

Aşı	Tahmini Minimum DOI	Tahmini Relatif Etkinlik (%)
Canine distemper (Modifiye Canlı Virus-MLV)	> 7 yıl	> 90
Canine distemper (Rekombinant-R)	> 1 yıl	> 90
Canine parvovirus-2 (MLV)	> 7 yıl	> 90
Canine adenovirus-2 (MLV)	> 7 yıl	> 90
Kuduz virus (Ölü-K)	> 3 yıl	> 85

Temel aşılama sonrası DOI'yi belirlemek için serolojik antikor test kitleri uygulanabilmektedir. Köpeklerin büyük çoğunluğunun uzun yıllar boyunca CDV, CPV-2, CAV-1 ve CAV-2'ye karşı koruyucu antikor titresini koruduğu çok sayıda yapılan deneysel çalışma ile gösterilmiştir. Ticari olarak üretilen iki adet serolojik test kiti mevcuttur; bu test kitleri pratikte ve barınak ortamında uygulanmış ve onaylanmıştır (Böhm ve ark., 2004; Day ve ark., 2016; Gray ve ark., 2012; Litster ve ark., 2012; Mitchell ve ark., 2012; Mouzin ve ark., 2004; Schultz, 2006). Negatif bir test sonucu, köpeğin çok az miktarda antikora sahip olduğunu veya hiç antikorunun bulunmadığını ve tekrar aşılanmanın önerildiğini göstermektedir. Bazı seronegatif köpekler ise aslında bağışıktırlar (yanlış-negatif) ve tekrar aşılama gereksizdir çünkü aşılamaya karşı hızlı ve önemli bir anamnestic yanıt verirler. Bununla birlikte, bu köpekler kolaylıkla tespit edilemediği için kullanılan teste bakılmaksızın, negatif sonuç veren bir hayvanın hiçbir antikora sahip olmadığı ve enfeksiyona potansiyel olarak duyarlı olduğu kabul edilmelidir. Buna karşın pozitif bir test sonucu, tekrar aşılanmanın gerekli olmadığı sonucunu net olarak ortaya koymaktadır (Chappuis, 1998; Day, 2007; Day ve ark., 2016).

Maternal antikorlar yeni doğan hayvanları pasif olarak koruduğu için, hayvanları çok genç bir yaşta başarılı şekilde aşılamak genellikle mümkün değildir. Bu aşamada immun sistemin uyarılması gerekli görülürse, anne gebeliğin son aşamalarında aşılanabilir ve bu aşılama protokolünün kolostrum oluşumu sırasında en yüksek antikor seviyelerine ulaşılacak şekilde zamanlaması yapılabilir. Canlı doğduktan sonra, başarılı şekilde aktif immunitenin sağlanması ancak pasif immunitenin azalmasından sonra etkili olmaktadır. Maternal bağışıklığın tam olarak ne zaman kaybolacağını tahmin etmek imkansız olduğu için, ilk aşılama protokolü

genellikle çoklu dozların uygulanmasını gerektirmektedir. Temel köpek ve kedi aşıları için mevcut yönergeler, aşının ilk dozunun 8-9 haftalık yaşta uygulanması gerektiğini, ardından 2-4 hafta sonra ikinci bir dozun uygulanmasını ve yaklaşık 16 haftalık yaşta sonlandırılması (bahsedilen aşılama rapel aşılama değildir) gerektiğini göstermektedir. Tüm hayvanlara 12 ay sonra veya 1 yaşında rapel doz yapılması gerektiği vurgulanmaktadır (Tizard, 2019).

Dünya Küçük Hayvan Veteriner Hekimler Derneği (WSAVA) Aşılama Yönergesi Grubu (VGG)'nin önerisi de; 6-8 haftalık yaşta ilk temel aşılamasının başlaması, daha sonra 16 haftalık yaşa kadar 2-4 haftada bir tekrar aşılamasının yapılmasıdır. Bu nedenle, yavru köpeğe uygulanan primer temel aşıların sayısı, aşılamının başladığı yaşa ve aşılar arasında seçilen aralığa göre değişmektedir. Bu önerilere göre aşılamaya 6 veya 7 haftalık yaşta başlanırsa 4 hafta arayla 4 temel aşı; 8 veya 9 haftalık yaşta başlanırsa aynı şekilde 4 hafta arayla 3 temel aşılama uygulaması yeterli olmaktadır (Day ve ark., 2016).

Yavruların temel aşılama programının bir parçası da; 12 aylık yaşta veya primer temel aşı serisinin bitiminden 12 ay sonra yapılan “rapel/güçlendirici” aşıdır. Bu aşının temel amacı, bağışıklık yanıtını zorunlu olarak 'artırmak' değil, yavrunun primer temel aşılama serisindeki aşıların herhangi birine yanıt verememesi ihtimalini değerlendirerek koruyucu immün yanıtın gelişmesini garantilemektir. Temel aşılar için, uygulanan “güçlendirici-Rapel” aşıdan sonra, en az 3 yıl başka bir temel aşı gereksinimi olmamaktadır. Uygulanan güçlendirici aşıyı takiben, 3 yıl veya daha uzun aralıklarla tekrar aşılamaları yapılabilir. Yetişkin hayvanlara üç yılda bir uygulanan tekrar aşılamasının genellikle ölü temel aşılar (kuduz aşısı hariç) veya temel olmayan aşılar ve özellikle de bakteriyel antijenler içeren aşılar (örneğin toksoid aşılar) için önerilmediği vurgulanmaktadır. Temel aşılar şu anda üç yılda bir uygulanırken, temel olmayan aşı ürünleri yıllık olarak uygulanmaktadır. Köpek ve kediler için kuduz çoğunlukla inaktif aşıların kullanımı ile kontrol edilmektedir. Yapılan tüm başlangıç kuduz aşılarını 1 yıl sonra tekrar aşıları takip etmelidir. Yalnızca ikinci kuduz aşısından sonra, 3 yıllık DOI etiketine sahip ürünle tekrar aşılama aralığı yasal olarak 3 yıla kadar uzatılabilir. İlk kuduz aşısı 12 haftalık yaştan

önce uygulanmamalıdır. Kuduz aşısı sonrası antikor titreleri ise genellikle aşılamadan 4 hafta sonra koruyucu seviyelere ulaşmaktadır (Day ve ark., 2016).

1.4.2. Aşılamamanın Olası Yan Etkileri

İmmün sistem, kalın bağırsak florası ve beyin fonksiyonları arasındaki çarpıcı ilişkiyi gösteren çok sayıda araştırma (Belkaid ve Hand, 2014; Fung ve ark., 2017; Kamada ve ark., 2013; Powell ve ark., 2017), köpeklerde belirli bir yaşın üzerinde ve rutin yapılan aşılamaların sinir sistemi ve sindirim sistemi üzerine etkileri ile ilgili önemli soruları da beraberinde getirmektedir. Araştırmalar, özellikle “temel” aşılar için belirli bir yaş ve tekrarın üzerindeki aşılamaların gereksiz olduğunu hatta bu şekilde sürdürülen aşılama takvimlerinin köpeklerde önemli yan etkilere neden olabileceğini ileri sürmektedir (Carmichael, 1999; Schultz, 2006).

Belirli bir yaşın üzerinde, tekrarlı aşı uygulamalarının anlamlı olmadığını ileri süren araştırmaların temelinde aşı bağışıklığının doğal bağışıklık cevabına benzer olduğu düşüncesi yatmaktadır. Köpeklerin CDV, CPV-2 ve CAV-1 enfeksiyonlarına doğal olarak yakalanıp iyileşmeleri durumunda hayat boyu bu virüslere karşı bağışık kaldıkları bilinmektedir. Bu görüşü temel alarak yapılan deneysel bir çalışma, köpeklerde CDV, CPV-2 ve CAV-1 enfeksiyonlarına karşı yapılan aşılama sonrası edinilen bağışıklığın da genellikle hayat boyu kalıcı olduğunu göstermektedir. Dahası aynı çalışmada yaşlı köpeklerin CDV, CPV-2 CAV-1 gibi enfeksiyöz hastalıklardan ender olarak ölümcül şekilde etkilendiği ve insanlardakinin aksine köpeklerde solunum hastalığı kompleksinden ölümlerin de oldukça seyrek olduğu vurgulanmaktadır (Schultz ve ark., 2010). Bu durum ilerleyen yaşlarda yapılan aşılamaların avantajlarından ziyade dezavantajlarının ön plana çıkması açısından önem taşımaktadır. Nitekim, tekrarlı uygulanan aşının yan etkilerini inceleyen bir araştırmanın sonuçları köpeklerde hayat boyu aşı uygulamalarının sürdürülmesi açısından oldukça düşündürücüdür (Vadalà, 2017). Söz konusu araştırma, lokal reaksiyonların yanı sıra nörolojik bozuklukların ve otoimmün hastalıkların gelişmesi açısından da aşılamadaki risklere dikkat çekmektedir.

Aşı enjeksiyonundan sonra eksprese edilen periferik proinflatuar sitokinlerin (IL-1 β , IL-6 ve t    r nekrozis fakt  r alfa-TNF- α) beyine ulaştığı ve mikroglia aktivasyonundan sonra n  roinflamasyona neden olabileceği d  ş  n  lmektedir.   eşitli aşıların içeriğinde bulunan al  minyum ve civa gibi adjuvanların, kronik beyin inflamasyonuna ve n  rotoksisiteye yol açarak mikrogliaı aktive ettiği   ne s  r  lmektedir (Pashine, 2005). Beyin, proinflatuar sitokinler olan IL-1 α , IL-1 β , TNF- α ve IL-6'yı molek  ler hastalık sinyalleri olarak tanımaktadır (Dantzer, 2009). Ayrıca TNF- α , IL-6 ve IL-1 β kan-beyin bariyerini geçebilmektedir ve hipotalamusa etki ederek canlıda hastalıkla ilişkili davranış paternlerini tetikleyebilmektedir (Dantzer, 2001).

İntestinal mikrobiyotanın immun sisteme bir  ok farklı sinyal g  ndererek aşı uygulamasına karşı oluşan yanıtı destekleyebileceği g  sterilmiştir. Bu sinyaller endotoksinler ve kısa zincirli yağ asitleri (short chain fatty acids; SCFA'lar) gibi sindirim sistemi   r  nlerine kadar değişkenlik g  sterebilmektedir. Sonuçta bu durum immun sistem işlevlerinin şekillenmesinde kilit bir rol oynamakta ve hem oral hem de parenteral olarak uygulanan aşılara verilen immun yanıtı etkilemektedir. SCFA'ların   retimi, B h  cre yanıtını desteklemektedir. Bu olumlu etkilerin   oğu, antibiyotikle tedavi edilen veya germ-free (GF) hayvanlarda ortadan kalkmaktadır. Antibiyotiklerle yoğun şekilde tedavi edilen hayvanlarda da benzer şekilde aşılamaya karşı oluşan yanıtların bozulmuş olabileceği belirtilmektedir (Lynn ve Pulendran, 2018; Tizard, 2019).

1.5. İmmun Sistem, Sinir Sistemi ve Mikrobiyota İlişkisi

Bağırsakta diğer t  m lenfoid dokulardan daha fazla immun sistem aktivitesinin mevcut olması ve v  cudun aktive edilen B h  crelerinin %80'inden fazlasının bağırsakta bulunduğunun tahmin edilmesi yukarıda belirtilen mikrobiyota ve immun sistem arasındaki ilişkiyi destekler niteliktedir. B h  crelerinin temel işlevleri, mikrobiyota tarafından olası bir invazyona karşı savunma yapmaktır. B h  creleri aynı zamanda, mikrobiyotanın bileşimini değiştirebilen ve mukozal penetrasyonu bloke edebilen Ig A   retmektedir. Devam eden Ig A yanıtıyla bakterilerin mukozal bariyeri

aşması önlenmektedir. Böylece Ig A yanıtı ve mezenterik lenf düğümleri, kommensal organizmaların sistemik immün sisteme ulaşmasını önleyen ek bir bariyer oluşturmaktadır (Tizard, 2018).

İntestinal epitel, inflamasyonu tetiklemeyi önlemek amacıyla mikrobiyotayı sınırlamak için doğal ve kazanılmış immün hücreleri kullanan, fakat ihtiyaç duyulduğunda daha güçlü savunma yanıtlarını etkinleştirmeye hazır olan oldukça duyarlı bir dokudur. Enterositler, intestinal mikrobiyota ile sürekli olarak etkileşim halindedir ve bakterileri öldüren veya etkisiz hale getiren çok sayıda peptit üretmektedir. Aynı zamanda regülatör sitokinleri salgılamakta, onlara karşı yanıt oluşturmakta ve dendritik hücrelere antijen sergilemektedirler. Epitel ve altındaki katman olan lamina propria içinde, IL-1 veya IL-23 tarafından uygun şekilde uyarıldığında efektör veya regülatör hücrelere farklılaşmayı düzenleyebilen intraepitelyal T lenfositler (IEL'ler) bulunmaktadır. Enterositler, TLR-1, -2, -3, -5 ve -9'un yanı sıra NOD-2 dahil olmak üzere birçok mikrobiyal ilişkili moleküler paternler (MAMP'ler) için reseptörleri eksprese etmektedir. Enterositler aynı zamanda, mikrobiyal invazyonu önleyerek intestinal duvarda inflamasyon gelişimini de önlemektedir. Enterositler tarafından üretilen bazı sitokinler ise, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi antijen işleyen hücrelerin regülatör aktivitelerini etkilemektedir (Tizard, 2018).

İntestinal yardımcı T hücre prekürsörleri, mikrobiyotadan alınan sinyallere bağlı olarak Treg veya Th17 hücrelerine farklılaşabilmektedir. İntestinal Treg ve Th17 hücreleri, CD4 yardımcı hücrelerin bir alt kümesidir. İntestinal homeostazis için Treg hücrelerinin üretimi tercih edilirken, Th17 hücrelerinin üretimi baskılanmakta ve intestinal duvarda minimal düzeyde inflamasyon meydana gelmektedir. Treg hücrelerinin yokluğunda, efektör T hücreleri, kontrolsüz bir şekilde mikrobiyal antijenlere yanıt vermekte ve inflamasyon tetiklenmektedir (Tizard ve Jones, 2018). Spesifik bakteri grupları da bu süreci ayrıca etkileyebilmektedir ve bazı bakteriler Th17 hücrelerini güçlü şekilde uyarırken, incelenen bakterilerin yaklaşık dörtte biri Treg hücrelerini uyarmaktadır. Örneğin, *Clostridium* IV ve XIVa gruplarının üyeleri Treg indüksiyonunu uyarak antiinflamatuvar yanıtı neden olurken, segmentli ipliksi

bakterilerin (Segmented filamentous bacteria; SFB) ise Th17 uyararak proinflamatuvar sinyal ürettiği gösterilmiştir (Atarashi ve ark., 2011). Diğer bakteriler doğal lenfoid hücreler (ILC'ler) ve dendritik hücreler üzerine etki göstermektedir (Geva-Zatorsky ve ark., 2017; Pilla ve Suchodolski, 2020; Tizard ve Jones, 2018).

Sağlıklı bir bağırsak mikrobiyotasının devamlılığı için pro-inflamatuvar sitokin Th17 ile anti-inflamatuvar sitokin Treg arasındaki dengenin sürdürülmesi önem taşımaktadır. İntestinal yardımcı T hücre fenotipleri Treg veya Th17 hücrelerine farklılaşabilirken Th17 hücreleri Th1 hücrelerine kadar diferansiye olabilir. Bu farklılaşma mikrobiyotadan gelen sinyallerle düzenlenir. Hem Treg hem de Th17 hücrelerinin gelişimi, TGF- β tarafından desteklenir. Treg hücreleri, TGF- β 'ya ek olarak retinoik asit ve IL-2'ye gereksinim duyarken Th17 hücreleri, TGF- β 'ya ek IL-6 ve IL-23'e gereksinim duymaktadır. Treg ve Th17 hücreleri tarafından kullanılan ana transkripsiyon faktörleri sırasıyla FoxP3 ve ROR γ t'dir. Bu faktörler efektör CD4+ hücrelerinde birlikte eksprese edilmektedir (Tizard, 2018)

İntestinal Treg hücreleri inhibe edici bir sitokin olan IL-10'un üretiminden sorumludur. Mukozal inflamasyon, çok sayıda IL-10 üreten Treg hücrelerinin üretilmesiyle baskılanmaktadır. IL-10 eksikliği olan fareler, IL-23 ve Th17 aracılığı ile kronik ve aralıksız bir şekilde seyreden kolit geliştirmektedir. Th17 hücreleri ise proinflamatuvar sitokinler olan IL-17 ve IL-22'yi üretmektedir. Treg hücreleri gibi, Th17 hücrelerinin gelişimi de mikrobiyotadan ve enterositlerden gelen sinyallerle düzenlenmektedir. Th17 hücre gelişimi, segmentli ipliksi bakterilerin enterositlere bağlanmasıyla spesifik olarak uyarılmakta ve enterositler bu bağlantıyı algılayarak ve makrofajlar tarafından IL-23 üretimini uyararak IL-17 ve IL-22 üretimine yol açmaktadır (Gaboriau-Routhiau ve ark., 2009; Tizard ve Jones, 2018).

SFB'ler, memelilerin (her ne kadar köpeklerde ve kedilerde henüz rapor edilmemiş olsalar da) ve kuşların ince bağırsağında bulunan uzun filamentli, gram-pozitif anaerobik kommensallerdir (Lecuyer ve ark., 2014). SFB'ler, doğal savunma genlerinin ve inflamatuvar sitokinlerin yukarı regülasyonunu uyarırlar. İleumda bulunan enterositlere çok güçlü bir şekilde bağlanabilirler (diğer kommensal

bakterilerin çoğu mukus tabakalarında kalır). SFB'ler, peyer plaklarında ve diğer intestinal lenfoid organlarda germinal merkezlerin gelişimini uyarır ve Ig A ve Th17 hücrelerinin üretimini artırır (Ivanov ve Honda, 2012; Tizard ve Jones, 2018).

Bağırsakta bulunan mikroorganizmalar, merkezi sinir sistemindeki (CNS) doku yerleşik immün hücrelerin olgunlaşmasını ve işlevlerini modüle etmektedir. Ayrıca bu mikroorganizmalar, nöroinflamasyon, beyin hasarı, otoimmünite ve nörogenez yanıtlarını düzenleyen periferik immün hücrelerin aktivasyonunu da etkilemektedir. Böylece hem bağırsak mikrobiyotası hem de immün sistem, otizm spektrum bozukluğu, depresyon ve Alzheimer hastalığı gibi nörogelişimsel, psikiyatrik ve nörodejeneratif hastalıkların etiopatogenezinde rol oynamaktadır (Fung ve ark., 2017).

Sağlıklı bir sinir sistemi fonksiyonu için bağırsak mikrobiyotası çok önemli bir role sahiptir. İntestinal mikrobiyotanın beyin gelişimini, fonksiyonunu ve davranışını düzenlediğine dair yapılan çok sayıda çalışma mevcuttur (Collins ve ark., 2012; Cryan ve Dinan, 2012; Sampson ve Mazmanian, 2015) ve bu çalışmalar gastrointestinal sistemdeki kommensal, probiyotik ve patojenik bakteri grubunun nöral yolları ve merkezi sinir sistemi sinyalizasyon sistemlerini aktive edebileceğini göstermektedir. Beyin, bağırsak ve mikrobiyota eksenini anlamaya yönelik yapılacak çalışmaların, anksiyete, depresyon ve bilişsel fonksiyon bozukluğunu da içeren çeşitli mental bozuklukların tedavisi için yeni yaklaşımlar sağlayabileceği düşünülmektedir.

Çeşitli epidemiyolojik veriler, nörodejeneratif hastalıkları bulunan insanların eşzamanlı olarak intestinal lezyonlara sahip olduğunu ve gastrointestinal (GI) sistemdeki histopatolojik değişikliklerin, nörodejeneratif değişikliklerden çok daha önce meydana geldiğini göstermektedir. Alzheimer hastalığı (AD), Parkinson hastalığı ve inflamatuvar merkezi sinir sistemi hastalıkları dahil olmak üzere birçok nörodejeneratif hastalıkta bağırsak mikrobiyomunda da değişiklikler bildirilmiştir (Ambrosini ve ark., 2019).

1.5.1. Köpeklerde Sindirim Sistemi Mikrobiyotası

İnsanlarda olduğu gibi evcil hayvanlarda da vücut yüzeyleri mikrobiyal organizmaların gelişebilmesi için oldukça zengin bir ekosisteme sahiptir. Bu vücut yüzeylerinde “mikrobiyota” olarak isimlendirilen bakteri, arkea, mantar ve viruslerden oluşan zengin bir popülasyon yer almaktadır. Bakteriler aralarında en çok çalışma yapılan popülasyonu oluşturmaktadır. Bu bakteriler deride, gözde, solunum sisteminde, ürogenital sistemin bazı kısımlarında ve esas olarak gastrointestinal sistemde yaşamaktadırlar. Güncel literatürlerde, bu organizmaların canlılığının vücut yüzeyleri ile ömür boyu süren yakın ilişkilerinin bir sonucu olarak mikrobiyotanın vücudun ayrılmaz parçası, “sanal organ”, olarak kabul edilebileceği söylenmektedir (Tizard, 2018).

Bağırsak mikrobiyotası, gastrointestinal sistemdeki tüm mikroorganizmaların (bakteriler, virüsler, mantarlar ve protozoa) toplamı iken, bağırsak mikrobiyomu bu mikroorganizmaların kollektif genomudur. Gastrointestinal sistemde 100 trilyondan fazla mikrobiyal hücre yaşamaktadır ve bu konakçı hücrelerin sayısından yaklaşık 10 kat daha fazladır (Human Microbiome Project Consortium, 2012; Ziese ve Suchodolski, 2021).

Bakteriler mikrobiyal hücrelerin çoğunluğunu oluşturur ve mideden kolona doğru artan miktarlarda gözlenmektedir (Swanson ve ark., 2011). Hücre kültürüne dayalı çalışmalarda, midede gram başına 10^1 - 10^6 koloni oluşturan birim (CFU) gösterilirken, ince bağırsakta 10^2 - 10^6 CFU/g, kolonda ise 10^{11} CFU/g. konsantrasyon gösterilmiştir (Mentula ve ark., 2005). İnce bağırsak aerobik ve fakültatif anaerobik organizmaları barındırırken, kolonik mikrobiyom esas olarak anaeroblardan oluşmaktadır (Honneffer ve ark., 2017; Ziese ve Suchodolski, 2021).

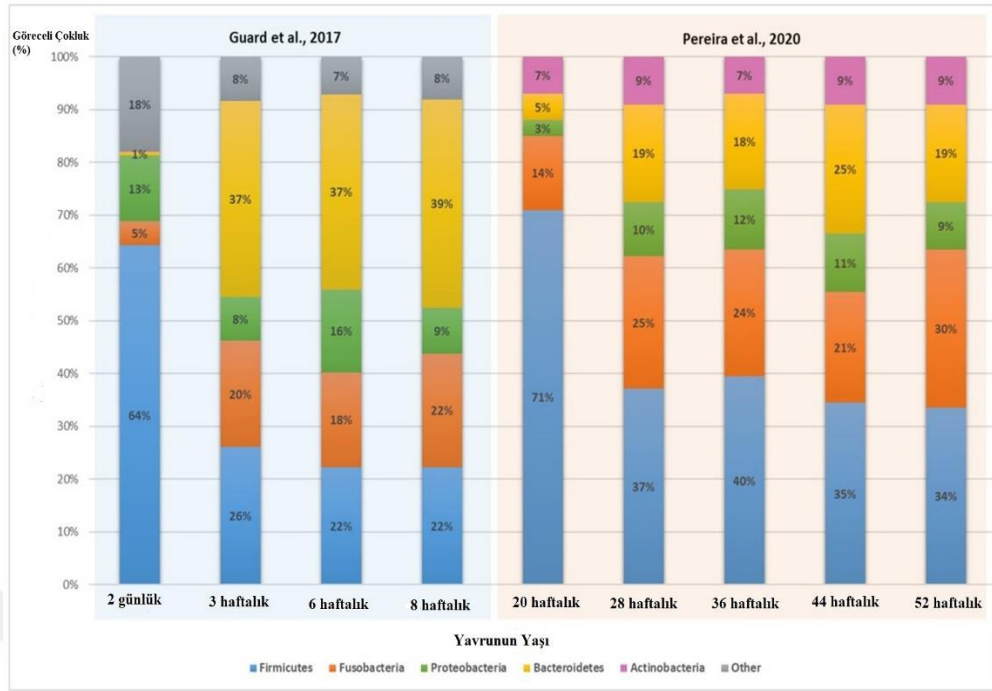
Sağlıklı köpeklerde dışkı örnekleri kullanılarak yapılan analizler sonucunda, birbiri ile tutarlı temel bakteri türleri tespit edilmiştir ve bu canlılarda temel mikrobiyotanın varlığı ortaya konulmuştur (Garrigues ve ark., 2022; Hand ve ark., 2013) ancak her köpeğin bağırsak mikrobiyotasının eşsiz olduğu, içerik açısından

oldukça farklılık gösterdiği ve bileşiminin diyet, genetik faktörler, antibiyotik maruziyeti ve çevresel faktörler tarafından belirlendiği göz ardı edilmemelidir (Hooda ve ark., 2012; Tizard ve Jones, 2018).

Hem yetişkin köpeklerde hem de yavru köpeklerde temel bakteri profili beş ana filadan oluşmaktadır: Firmicutes (%48), Fusobacteria (%17), Bacteroidetes (%12), Proteobacteria (%23) ve Actinobacteria (%1) (Blake ve ark., 2020; Garrigues ve ark., 2022; Guard ve ark., 2017; Tal ve ark., 2021; Zakošek ve ark., 2020). Fusobacteria ve Bacteroidetes en fazla ileumda ve kolonda bulunmaktadır. Dengeli intestinal mikrobiyota, köpeklerde gastrointestinal sistem sağlığı için temel faktördür (Deng ve Swanson, 2015; Hooda ve ark., 2012; Tizard ve Jones, 2018).

Köpeklerde, insanlara benzer şekilde, mikrobiyomun yetişkinlere benzer bir kompozisyona maturasyonu, süten kesilme dönemi ile aynı zamana denk gelmektedir. 1 haftalıktan 1 yaşına kadar olan yavru köpeklerle yapılan bir çalışmada (Cigarroa ve Suchodolski, 2018), yavruların yaşamlarının ilk birkaç haftasında Proteobacteria'nın baskın olduğu önemli ölçüde farklı bir mikrobiyoma sahip oldukları sonucuna ulaşılmıştır. Ancak 9 haftalıkken Proteobacteria önemli ölçüde azalmış ve Firmicutes filasında bulunan *Faecalibacterium spp.* ve *Clostridium hiranonis*, sağlıklı yetişkinlerin referans aralığı içindeki değerlere yükselmiştir (Pilla ve Suchodolski, 2020).

Mikrobiyal değişimlere neden olan ana faktörlerin çoğu köpek büyüdükçe (oksijen homeostazı, diyet geçişi, çevresel faktörler) gerçekleşmiş olduğu için, mikrobiyota bileşimi, yavru köpeğin yaş almasıyla birlikte daha kararlı hale gelmeye başlamaktadır. Böylece, yavruların dışkıdaki mikrobiyal tür zenginliği 2 günlükten 52 haftalık (Boucard ve ark., 2021; Guard ve ark., 2017; Pereira ve ark., 2020) olana kadar önemli ölçüde artarken, 3 aylık yaştan 12 yaşına kadar köpeklerde mikrobiyal çeşitlilikte çok az hatta hiç değişiklik gözlenmediği ifade edilmiştir (Şekil 1.4) (Garrigues ve ark., 2022; Omatsu ve ark., 2018; Vilson ve ark., 2018; You ve Kim, 2021).



Şekil 1.4. Köpeklerde yaşla birlikte ana bakteri filalarında şekillenen göreceli çokluk yüzdeleri (Garrigues ve ark., 2022).

İntestinal mikrobiyom gastrointestinal sistemin gelişiminde rol alır, bağışıklık sistemini modüle eder, konakçıyı patojenlerden korur, intestinal bariyer işlevine yardımcı olur ve yararlı metabolitler sağlar. Sağlıklı bir mikrobiyom, intestinal bariyerin sağlam olmasına katkıda bulunur çünkü tight junction oluşumunu destekleyerek patojenlerin, toksinlerin veya diyet antijenlerinin translokasyonunu önler (Gasbarrini ve Montalto, 1999). Önemli mikrobiyal yollara örnek olarak safra asidi (BA), SCFA ve indol metabolizması verilebilir (Ziese ve Suchodolski, 2021).

Safra asitleri, lipid sindirimi için gereklidir, ancak aynı zamanda mukozal savunmada da rol oynamaktadır ve antiinflamatuvar özelliklere sahiptir (Pilla ve Suchodolski, 2020). Son zamanlarda yapılan araştırmalar, özellikle bağırsak BA'larının ve BA 7a-dehidroksile edici bakteri olan *Clostridium hiranonis*'in köpeklerde konakçı sağlığında ve normal mikrobiyotanın korunmasında önemli bir rol oynadığını göstermiştir (AlShawaqfeh ve ark., 2017; Pilla ve ark., 2020; Vazquez-Baeza ve ark., 2016). Köpeklerde, *C. hiranonis*, BA dönüştürücü ana bakteri türüdür

(Chaitman ve ark., 2020; Giaretta ve ark., 2018). Tilosin veya metronidazol gibi geniş spektrumlu antibiyotikler, *C. hiranonis*'in azalmasına ve dolayısıyla sekonder BA dönüşümünde azalmaya yol açmaktadır. Bu azalma durumu, bazı köpeklerde uzun süreli subklinik disbiyozaya yol açabilmektedir (Chaitman ve ark., 2020; Manchester ve ark., 2019; Pilla ve ark., 2020). Diğer önemli metabolitler arasında, sırasıyla karbonhidrat ve proteinlerin mikrobiyal fermentasyonu sonucu oluşan SCFA ve indoller bulunmaktadır. *Ruminococcus*, *Faecalibacterium* ve *Turicibacter* gibi bazı bakteriler, besin içeriğindeki karbonhidratları SCFA'lara fermente etmektedir (Arpaia ve ark., 2013). Bu SCFA'lar, özellikle bütirat, asetat ve propiyonat, besin işlevi görmek, tokluğu düzenlemekte, antiinflamatuar özellik göstermekte, bağırsak motilitesini düzenlemekte ve pH'a duyarlı enteropatojenler için uygun olmayan bir ortam yaratmak amacıyla bağırsak pH'sını düşürmektedir (Cherrington ve ark., 1991; Rowland ve ark., 2018). İntestinal bakteriler tarafından esansiyel amino asit triptofandan metabolize edilen indol bileşikler ise bağırsak permeabilitesinin gelişiminde rol oynamakta ve müsin üretimini artırmaktadır (Whitfield-Cargile ve ark., 2016). Diğer mikrobiyal kaynaklı metabolitlere örnek olarak B ve K vitamini verilmektedir (Ziese ve Suchodolski, 2021).

1.5.2. Uçucu Yağ Asitlerinin İntestinal Mikrobiyota Üzerine Etkileri

Diyet içeriğindeki lif, ince bağırsakta enzimatik sindirime ve absorpsiyona uğramadan nispeten değişmeden kalın bağırsağa ulaşmaktadır. Diyet lifi hem çözünür hem de çözünmez lif içermektedir (National Research Council, 2006). Arabinoksilan, β -glukan ve fruktanlar gibi çözünebilir lifler, intestinal mikrobiyota tarafından kolayca fermente edilmekte ve sağlıklı intestinal ortam oluşturma, homeostazis ve tokluk gibi etkileri nedeniyle güncel olarak araştırılmaya devam edilmektedir (Makki ve ark., 2018). Bu etkilerin altında yatan mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılamamış olsa da, birkaç faktörün söz konusu olabileceği görülmektedir. Etkili faktörlerden birisi, bakteriyel fermentasyon sırasında spesifik metabolitler olan başta asetat, propiyonat ve bütirat olmak üzere SCFA'ların üretilmesidir (Riviere ve ark., 2016). Bütirat, kolonositlerin tercih ettiği enerji kaynağıdır ve bariyer fonksiyonu için hayati bir öneme sahiptir (Hamer ve ark.,

2008). Ayrıca SCFA kolondaki pH'yı düşürerek *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* (Cummings ve ark., 2004; Myint ve ark., 2017) gibi potansiyel olarak yararlı bakterileri desteklerken *Clostridium perfringens* ve *Escherichia coli* (AlShawaqfeh ve ark., 2017; Suchodolski ve ark., 2012) gibi köpeklerde gastrointestinal hastalıkla ilişkili bakterilerin proliferasyonunu kısıtlamaktadır. SCFA'nın hem doğrudan merkezi iştah regülasyonu yoluyla (Frost ve ark., 2014) hem de tokluk hormonlarının salınımını uyararak dolaylı olarak tokluğu arttırdığı gösterilmiştir (Koh ve ark., 2016). Mikrobiyota içeriğini oluşturan türlerin kompozisyonu, diyet lifinin fermentasyonu sırasında üretilen SCFA'nın türü ve seviyeleri için önemli bir belirleyicidir, SCFA üretimi ayrıca diyet lifinin türüne ve çözünübilirliğine de bağlıdır (Chen ve ark., 2017; Palmqvist ve ark., 2022).

Bitkisel diyet lifleri ayrıca sekum ve kolonda Clostridia tarafından sindirildiğinde, bu kompleks karbonhidratlar, makrofajları baskılayan ve intestinal Foxp3+ Treg hücrelerinin üretimini destekleyen bütirat, propiyonat ve asetat gibi büyük miktarlarda kısa zincirli yağ asitleri üretir. Bütirik asit, makrofajlar üzerinde etki göstererek ve histon deasetilazları inhibe ederek epigenetik değişiklikleri önlediği için antiinflamatuvar etkilere sahiptir. Bütirat ayrıca enterositleri uyararak ve müsin genlerinin transkripsiyonunu, goblet hücresi farklılaşmasını ve mukus üretimini artırarak bariyer fonksiyonlarını artırmaktadır. Sonuç olarak, yüksek lifli diyetler intestinal inflamasyonun regülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. İntestinal mikrobiyota, asetat üretimini artıracak şekilde değişirse, parasempatik sinir sistemi aktive olmakta ve glikozla uyarılan insülin üretimi desteklenmektedir. Bu uyarım, iştahı artıran, gıda alımının ve obezitenin artmasına yol açan ghrelin adı verilen açlık hormonunun üretimini uyarmaktadır (Tizard, 2018).

Bütirat üreten ana bakteriler, Bacteroidetes ve Clostridia'yı içeren anaeroblardır ve kolondaki düşük O₂ konsantrasyonu onlar için oldukça uygun bir ortam oluşturmaktadır. İnsanlarda Bacteroidetes üyeleri esas olarak asetat ve propiyonat üretirken, Firmicutes çoğunlukla bütirat üretmektedir (Louis ve Flint, 2009; Louis ve Flint, 2017; Venegas ve ark., 2019). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, karnivorlarda, özellikle *Clostridium perfringens*'in, proteinden bütirat

üretimine izin veren bütirat kinaz yolu ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır (Vital ve ark., 2015). Protein kaynaklarından bütirat ürettiği bilinen bir başka bakteri, en az 1 yıl boyunca et bazlı çığ diyet ile beslenen bir grup köpekte daha fazla bulunan *Fusobacterium varium*'dur (Potrykus ve ark., 2008). *Fusobacteriaceae* familyasının üyelerinin diğer karnivor türlerinde (kedi: Bermingham ve ark., 2013; Bermingham ve ark., 2018) ve çığ beslenen köpeklerde daha fazla olduğu bulunmuştur (Bermingham ve ark., 2017; Pilla ve Suchodolski, 2020; Sandri ve ark., 2017; Schmidt ve ark., 2018).

İntestinal bariyerin bozulması ve disbiyoz durumu, intestinal homeostazı ve immünolojik toleransı etkileyebilen SCFA ve triptofan gibi metabolit üretimi dahil olmak üzere çeşitli metabolik değişiklikleri indüklemektedir (Franzosa ve ark., 2019; Lavelle ve Sokol, 2020). Artan kanıtlar, insanlarda IBD (Inflammatory Bowel Disease; Yangısal Bağırsak Hastalığı) hastalarından alınan dışkı örneklerinde SCFA üreten bakterilerin miktarının önemli ölçüde azaldığını, bunun intestinal SCFA düzeylerinin düşmesine ve intestinal infamasyonun şiddetlenmesine yol açtığını göstermektedir (Berry ve ark., 2019). İnsanlardakine benzer şekilde kronik enteropatisi olan köpeklerde, asetat ve propionatın dışkıdaki konsantrasyonları da sağlıklı köpekler ile kıyaslandığında daha düşüktür (Lavelle ve Sokol, 2020). Daha önce bahsedildiği gibi, SFCA üreten bakteri filasının simgesi olan *Bacteroidetes*'in, insan ve köpeklerdeki IBD durumunda azaldığı bildirilmiştir (Franzosa ve ark., 2019; Minamoto ve ark., 2019; Vich Vila ve ark., 2018). Buna ek olarak bazı *Faecalibacterium* türleri, *Roseburia*, *Eubacterium* ve *Ruminococcus* suşları dahil olmak üzere diğer SFCA üreten bakteriler de insan ve köpeklerde IBD hastalığında azalmaktadır. Bütiratın, *Clostridioides difficile* kaynaklı kolit şekillenen farelerde intestinal bariyer fonksiyonunu eski haline getirdiği, kolitin klinik ve patolojik özelliklerini hafiflettiği bilinmektedir (Franzosa ve ark., 2019; Hernandez ve ark., 2022; Lavelle ve Sokol, 2020; Minamoto ve ark., 2019).

Köpeklerde disbiyozis ve enteropatinin intestinal mikrobiyotaya olan etkisini araştıran çalışmalarda IBD'li köpeklerde *Fusobacteria* filyumunda azalmanın yanı sıra özellikle *Bacteroidaceae* ve *Prevotellaceae* familyalarını içeren *Bacteroidetes*

filyumunda da azalma olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda IBD'li köpeklerde Firmicutes filyumu içinde, *Ruminococcaceae*, *Veillonellaceae* ve *Lachnospiraceae* familyalarında düşüş şekillendiği bulunmuştur (Minamoto ve ark., 2019; Minamoto ve ark., 2015; Suchodolski ve ark., 2012). Bu bakteri taksonlarının azalması SCFA üretmeleri nedeniyle, kolonositler için ana enerji kaynağı olan SCFA'ların miktarında azalmalara neden olmaktadır (Minamoto ve ark., 2019; Pilla ve Suchodolski, 2020).

1.5.3. Bağırsak-Beyin Aksisi

Bağırsak-beyin aksisi (GBA), bağırsak ve beyin arasında endokrinolojik, immünolojik ve nöral mediatörlerden oluşan oldukça karmaşık bir ağdır. GBA'ya CNS, beyin, omurilik, otonom sinir sistemi, enterik sinir sistemi (ENS), hipotalamo-hipofiz-adrenal aksisi (HPA) ve bağırsak mikrobiyotası aracılık etmektedir (Grenham ve ark., 2011). Enterik sinir sistemi bağımsız çalışabilme ve sempatik (prevertebral gangliyonlar) ve parasempatik (vagus siniri) sinyaller aracılığı ile CNS'den etkilenme yeteneğine sahiptir (Kowalski ve Mulak, 2019). Gastrointestinal kanalın ekstrinsik sinirleri, bağırsaklardan beyne vagal ve spinal afferent lifler ile bağlanırken, beyin GI sisteme efferent sempatik ve parasempatik lifler göndermektedir (Browning ve Travagli, 2014; Grasset ve ark., 2017; Grenham ve ark., 2011). Bağırsak-beyin aksisinin bileşenleri, otonom sinir sistemi içinde birbirleriyle hem antagonistik hem de sinerjistik olarak çift yönlü bir iletişim kurmaktadır (Mulak ve Bonaz, 2004). HPA, fizyolojik stres yanıtının ana mod lat r  olarak bilinmekte, ancak aynı zamanda glikoneogenezi kolaylaştırmak için sindirim sırasında beslenme fonksiyonunu da modüle etmektedir (Tsigos ve Chrousos, 2002). Hipotalamus, kortikotropin serbestleştirici faktör (CRF) salgılamakta ve bu familya içindeki farklı proteinlerin (CRF,  rokortin 1-3 gibi) GI kanal fonksiyonu, yani bağırsak motilitesini (Kihara ve ark., 2001), permeabilitesini (Zheng ve ark., 2013) ve inflamasyonu (Dinan ve ark., 2006) etkilediği bilinmektedir. Bağırsak motilitesi ve permeabilitesi, epitel sıvısının korunması, lümen ozmolaritesi, safra salgılanması, karbonhidrat seviyeleri, bikarbonat ve mukus üretimi ve aynı zamanda mukozal immun yanıt gibi temel gastrointestinal fonksiyonlar otonom sinir

sistemi tarafından kontrol edilmektedir (Wehrwein ve ark., 2016). Otonom sinir sistemi aracılığıyla bağırsaklardan gelen visseral bilgi, daha sonra hayatta kalmak için gerekli olan tepkileri yöneten merkezi sinir sistemi tarafından işlenmektedir. Otonom sinir sistemi, hedef organın innervasyonu yoluyla hem sağlık hem de hastalık durumunda (Bienenstock ve ark., 2015) ağrı yanıtı (Mayer ve Tillisch, 2011) ve stres (Ulrich-Lai ve Herman, 2009) gibi hızlı değişimlere aracılık ederek bağırsağa doğrudan nörolojik yanıt sağlanmasında rol oynamaktadır (Cryan ve ark., 2019).

Birkaç bakteri suşunun intestinal lümendeki nörotransmitter prekürsör seviyelerini değiştirebildiği ve hatta gama aminobütirik asit (GABA), serotonin (5-HT), dopamin (DA) ve noradrenalin (NA) gibi nörotransmitterleri bağımsız bir şekilde sentezleyebildiği gösterilmiştir (Calvani ve ark., 2018; Fung ve ark., 2017; Sherwin ve ark., 2018). Bu nörotransmitterler potansiyel olarak mikrogial aktivasyonu ve çeşitli serebral fonksiyonları etkileyebilmektedir (Abdel-Haq ve ark., 2019). Ayrıca otonom sinir sisteminin sempatik dalı da intestinal homeostaz ve immun regülasyonda görev almaktadır (Kim ve ark., 2017; Silva ve ark., 2020).

Cattaneo ve ark. (2017)'ları Alzheimer hastalarından alınan dışkı örneklerinde inflamasyona aracılık eden *Escherichia/Shigella* bakteri sınıfının, kontrol grubuna göre arttığını belirlemiştir. Ayrıca, bu bakteri taksonlardaki artışın, tam kanda IL-1 gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonundaki artışla pozitif korelasyona sahip olduğunu göstermiştir. Bu tür sonuçlar, mikrobiyota disregülasyonu ile sistemik inflamasyon arasında Alzheimer hastalığında olduğu gibi beyinde meydana gelen nörodejenerasyonu başlatan veya şiddetlendirebilen nedensel bir bağlantı olduğunu düşündürmektedir. İntestinal permeabilitenin yaşla birlikte arttığı göz önüne alındığında, bakteri veya bakteriyel komponentler (Örneğin; lipopolisakkaritler) intestinal lümenden transloke olabilir ve sistemik nöroinflamasyona aracılık edebilir (Sherwin ve ark., 2018).

Yapılan bir çalışmada psikolojik stres altında bulunan ratların kolonlarında artmış bağırsak motilitesi ile birlikte eş zamanlı olarak intestinal epitelyal tight junction proteinlerinin azaldığı gösterilmiştir (Zheng ve ark., 2013). İntestinal

bariyerin bozulması, dolaşımdaki proinflamatuvar sitokinlerin ve bakteri kaynaklı metabolitlerin artmasına, kan-beyin bariyerinin (BBB) bozulmasına ve nöroinflamasyona yol açmaktadır (Kowalski ve Mulak, 2019). Bir başka çalışmada GF farelerin, normal bağırsak mikrobiyotası olan spesifik patojen free (SPF) farelerine kıyasla BBB'nin geçirgenliğini arttığını ve GF farelerinde bağırsak mikrobiyotasının rekonstrüksiyonu ile BBB'nin geçirgenliğinin azaldığı ve tight junction proteinlerinin ekspresyonunun up-regüle edildiği gösterilmiştir (Hornberg ve ark., 1995).

Ek olarak, bağırsak mikrobiyotası, serotonin, dopamin veya SCFA'lar gibi çeşitli nörotransmitterlerin ve nöromodulatorlerin doğrudan sentezi yoluyla CNS fonksiyonunu etkileyebilmektedir (Yano ve ark., 2015; Bhattacharjee ve Lukiw, 2013). SCFA'lar, yani asetik asit, butirik asit ve propiyonik asit, kolondaki besinsel lifin bakteriyel fermantasyonu ile üretilmektedir ve sempatik sinir sistemini, serotonin salgılaması için uyararak, öğrenme ve bellek gibi bilişsel süreçleri etkilemektedir (Grider ve Piliand, 2007).

1.6. Köpeklerde Yaşlanma

Yaşlanma, canlının dış ve iç stresörlere karşı vücut homeostazisini sürdürme yeteneğinin progresif olarak azalmasına neden olan karmaşık, doğal ve ontogenetik sürecin bir parçasıdır (Mc Kenzie ve ark., 2022). AAHA tahmini yaşam süresinin son %25'i içinde olan köpekleri “senyör köpek” olarak tanımlamaktadır (Creevy ve ark., 2019).

Yaşlanma ve yaşlanma olgusunu açıklamak için çeşitli teoriler öne sürülmüştür. Bu teorilerin çoğu, somatik mutasyon ve gen regülasyonu teorileri gibi genetik kontrollere odaklanırken diğerleri, çeşitli vücut sistemlerinin homeostatik mekanizmalar üzerindeki geçici değişikliklerin etkisi veya hücresel yaşlanmanın bir sonucu olarak zararlı ürünlerin birikimi üzerinde durmaktadır. Örneğin, oksidatif stres teorisi, yaşlanmanın enerji harcamasıyla ve mitokondriyal solunum ve immün hücre reaksiyonları gibi internal kaynakların yanı sıra eksternal kaynaklardan köken

alan serbest radikallerin neden olduğu kümülatif hücresele hasarla bağlantılı olduğunu varsaymaktadır (Beckman ve Ames, 1998; Harman, 1956). Ancak bu teoriler tek başına yaşlanma sırasında gözlemlenen tüm değışiklikleri açıklamakta yeterli olmamaktadır. Bir diğer görüş ise, yaşlanmanın genetik ve sayısız iç ve dış çevresel faktörden etkilenen çok yönlü süreç olduğudur (Bellows ve ark., 2015).

1.6.1. Köpeklerde Yaşlanmaya Bağlı Şekillenen Fiziksel Değişiklikler

Evcil köpeklerin ortalama yaşam süresi genel olarak 6,7-12 yıl arasında değışmektedir. Küçük ırk köpekler büyük ırklara göre daha uzun süre yaşama eğilimindedir. Yaşlanma sürecini insülin benzeri büyüme faktörü 1 gibi artan hormonal aktiviteler ve büyük ırklarda büyümenin daha hızlı olması, vücutlarının hastalıklara karşı daha duyarlı olması hızlandırmaktadır. Evcil hayvanlarda yaş hesaplaması tür ve ırka göre değışmektedir. Küçük ırk köpekler 7 yaşında geriatrik kabul edilirken, büyük ırk köpekler 6 yaşında geriatrik kabul edilmektedir. Evcil hayvanlar genel olarak, ırka bağlı yaşam süresinin son %25'lik dilimindeyse geriatrik olarak değeriendirilmektedir (Rajapaksha, 2018). Geriatrik köpekler, veteriner hekimliği literatüründe genel olarak “senyör köpek” olarak tanımlanmaktadır (Landsberg, 2005).

Köpeklerde yaşlanmayla birlikte ilk olarak dikkati çeken değışiklik fenotipik özelliklerden kaynaklanmaktadır. Bu değışikliklerden bazılarına örnek olarak deri ve tüy kalitesindeki değışiklikler, lens opasifitesinin artması, kas kitlesinde azalma ve vücut kondisyon skoru değışimleri verilebilir (Mc Kenzie ve ark., 2022). Bu değışimler, yaşlanmanın bir parçası olarak herhangi bir hastalık süreci olmadan da gerçekleşebilmektedir.

1.6.1.1. Deri ve Tüy Sağlığında Şekillenen Değişiklikler

Yaşlanmayla birlikte hem epidermiste hem de dermiste sellüler atrofi artmaktadır. Foliküller de atrofiye olarak tüy dökülmelerine neden olabilmektedir.

Elastik liflerdeki artan kalsiyum içeriği ve psödoelastinin sonucu olarak cilt elastikiyeti kaybolmaktadır. Bu elastikiyet kaybına sıklıkla hem deri hem de kıl foliküllerinin hiperkeratozu eşlik etmektedir. Kıl foliküllerinde şekillenen melanosit kaybı ve tirozinaz enziminin etkinliğinin azalması, yaşlı köpeklerin genellikle ağız çevresinde ve yüz bölgesinde beyaz tüylerin üretilmesine neden olmaktadır (Muler ve ark., 1983). Yaşlı hayvanlarda sebum üretimindeki değişiklikler ve kıl foliküllerinin bazal membranlarında yüksek oranda sülfatlanmış glikozaminoglikan bulunması ve konsantrasyonlarının yaşla birlikte artması derinin pul pul olması ile sonuçlanabilmekte ve tüylerin kuru ve mat görünümde olmasına neden olabilmektedir (Bellows ve ark., 2015).

1.6.1.2. Vücut Kondisyonu ve Kiloda Şekillenen Değişiklikler

Yaşlanmayla birlikte bazal metabolizma hızı azalmaktadır ve insanlarda olduğu gibi, köpeklerde de vücut kondisyonu ve beslenme durumundaki farklılıklardan bağımsız olarak toplam vücut yağı (adipozite) yaşla birlikte artmaktadır (Mc Kenzie ve ark., 2022). Genç yetişkin ve yaşlı köpeklerde yapılan bir çalışmada (Zoran, 2010) genç yetişkinlerin vücut yağ yüzdesinin %15-20 arasında olduğu, yaşlı köpeklerinkinin ise %25-30 arasında olduğu bildirilmiştir. İnsanlarda yaşa bağlı olarak adipoz dokunun subkütanöz depodan visseral depolara dağılımı, insülin direnci, metabolik disfonksiyon, inflamasyon ve yaşla birlikte bozulmuş rejeneratif kapasitenin oluşumunda merkezi bir rol oynamaktadır. Yakın zamanda köpeklerde de visseral ve subkutan yağ oranında yaşla birlikte benzer bir artış gösterilmiştir (Mc Kenzie ve ark., 2022).

1.6.1.3. Adipokin Salgısı ve Kronik İnflamasyon

Yağ dokusu, TNF-alfa ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin yanı sıra, metabolik fonksiyonu ve obezite ile ilişkili birçok hastalığın patofizyolojisini etkileyen adipokinler olarak adlandırılan yağa spesifik faktörler olan anahtar sinyal peptitleri salgılar. Adiponektin, doğrudan insülin sensitivitesini artıran ve insanlarda

ve rodent modellerinde gelişmiş metabolik sağlık ve yaşam süresinin uzaması ile ilişkilendirilen anti-inflamatuar adipokindir. Bununla birlikte, klinik çalışmalar, adiponektin ile obezite ilişkili kardiyak disfonksiyon ve miksomatöz mitral kalp hastalığı arasında ilişki olabileceğini göstermiştir (Fasshauer ve Blüher, 2015).

Adipokinler, immün hücreler üzerindeki reseptörleri aktive ederek hem lokal hem de sistemik inflamasyonu etkiler ve adipokinlerdeki değişiklikler, metabolik disregülasyon ve artmış inflamatuvar sitokinler ile ilişkilidir. Yaşlanma ile ilişkili, düşük dereceli sistemik inflamasyon durumu "inflammaging" olarak isimlendirilmiştir ve bu durumun insanlarda fiziksel ve bilişsel fonksiyonlarda azalmanın habercisi olduğu gösterilmiştir (Ferrucci ve Fabbr, 2018; Ouchi ve ark., 2011).

1.6.2. Köpeklerde Yaşla Birlikte Organ Sistemlerinde Şekillenen Değişiklikler

Canlılarda yaşlanmaya bağlı olarak, vücut sistemlerinde fonksiyonel olarak ortaya çıkan fizyolojik değişikliklerin başlıcaları aşağıda sıralanmıştır:

1.6.2.1. İskelet ve Kas Sistemlerindeki Değişiklikler

Kas ve kemik kütlesi köpeklerde yaşla birlikte azalmaktadır. Aynı şekilde miyositlerin de hem sayısı hem de boyutu yaşla birlikte azalmaktadır. Ek olarak, yaşlı köpeklerde protein devrinin, çok yüksek düzeyde proteinle beslenen köpeklerde bile azaldığı belirtilmektedir. Köpekler yaşlandıkça beslenme ihtiyaçlarının fark edilmemesi, yaşlanan köpeklerde meydana gelen kas kitlesi kaybını hızlandırabilmektedir (Bellows ve ark., 2015).

1.6.2.2. Kardiyovasküler Sistemdeki Değişiklikler

Köpeklerde yaşla birlikte meydana gelen ve normal kabul edilen vasküler değişiklikler, kan damarlarının hiyalin kalınlaşmasını, aortun intimasında ve periferik arter bölümlerinde artan kalsiyum birikimini içerir (Bright ve Mears, 1997). Bu değişiklikler, kalp üzerindeki yükte artışa neden olarak konjestif kalp yetmezliği gelişimine neden olabilir. Orta yaştan itibaren kardiyak output kademeli olarak azalır ve geriatric köpeklerde %30'a kadar düşebilir. Yaşlandıkça egzersiz sırasında maksimum kalp atış hızı ve oksijen tüketimi de azalır. Köpeklerde yaşlanmanın kardiyak fonksiyon üzerindeki etkilerini değerlendiren sınırlı sayıda çalışma olmasına rağmen, yaşlı köpeklerin kardiyak strese genç köpeklerle aynı şekilde tepki verme yeteneğini olumsuz etkileyen yaşa bağlı bazı değişiklikler olduğu görülmektedir (Bellows ve ark., 2015).

1.6.2.3. Solunum Sistemindeki Değişiklikler

Köpeklerde yaşlanma ile birlikte pulmoner alveoller genişler ve birleşir, bu durum akciğer elastikiyetinin azalmasına ve gaz değişimi için yüzey alanının azalmasına yol açar (Mauderly, 1979). Ek olarak, köpeklerde yaşla birlikte solunum kontrolünün değiştiği, ventilasyonun azaldığı ve yavaş dalga uykusu sırasında hipoksiye verilen yanıtların olduğu gösterilmiştir (Bellows ve ark., 2015).

1.6.2.4. Üriner ve Renal Sistemdeki Değişiklikler

Beagle'larda yaşla ilişkili böbrek fonksiyonundaki klinik değişiklikler, 13 yıllık süreç boyunca yürütülen bir çalışma ile değerlendirilmiştir (Kaufman, 1984). Sonuçlar, nefrosklerozisin yaşlı köpeklerde en sık teşhis edilen böbrek lezyonu olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu çalışma ile elde edilen veriler, böbreklerde şekillenen ve normal olarak kabul edilen yaşlanmanın, klinik belirtiler veya biyokimyasal değişiklikler meydana gelmeden önce %75'e kadar nefron kaybına yol açabileceğini de göstermiştir (Bellows ve ark., 2015).

1.6.2.5. Endokrin Sistemdeki Değişiklikler

Köpeklerde yaşla birlikte adrenal korteks sekresyonu, serum kortizol ve aldosteron konsantrasyonlarında ve HPA eksenini regülasyonunda yaşa bağlı değişiklikler bildirilmiştir (Reul ve ark., 1991).

Labrador Retrieverlerin yaşamları boyunca yürütülen bir başka çalışmada, total triiyodotironin (T3), T4 ve serbest T4 konsantrasyonlarında yaşa bağlı düşüşler ve T4 otoantikör konsantrasyonunda yaşa bağlı artışlar tespit edilmiştir (Bellows ve ark., 2015; Lawler ve ark., 2007).

1.6.2.6. İmmun Sistemdeki Değişiklikler

Merkezi sinir sistemi ile birlikte, immün sisteminin organizmada temel bir sistemik regülatör işlevi vardır. İmmün hücrelerin çoğu, parakrin veya endokrin şekilde hareket eden ve ayrıca çeşitli patojenlere karşı savunma sağlayabilen çeşitli sinyal moleküllerini sentezler. Köpeklerde immün sistem yaşla birlikte, “immün yaşlanma” olarak da tanımlanan karmaşık yeniden yapılanmaya uğrar. Hem immün yaşlanma hem de inflamming, köpeklerde yaşlanmaya ve yaşa bağlı patolojilere katkıda bulunanlar süreçler olarak ele alınmaktadır (Day, 2010).

Senyör köpeklerde yapılan bir çalışmada enfeksiyonlar ve aşılama gibi yeni antijenik uyarımlara karşı, saf T hücrelerinin periferik havuzunda azalma ve T hücre reseptörlerinin repertuarında gözlemlenen azalmış çeşitlilik bu köpeklerde şekillenen bağışıklık yanıtının bozulduğu göstermektedir (Holder ve Mirczuk, 2018).

1.6.3. İntestinal Mikrobiyotada Şekillenen Değişiklikler

Son bulgular, hem sistemik metabolizmanın hem de bağışıklık fonksiyonunun, bağırsak mikrobiyomu tarafından modüle edilebileceğini

göstermektedir (Tremaroli ve Bäckhed, 2012). Mikrobiyom, konakçı organizma ile çeşitli kimyasal sinyaller aracılığıyla etkileşime girebilir ve bunlardan bazıları sinir sistemi işlevini doğrudan etkileyebilir (Sharon ve ark., 2016). Bu nedenle, mikrobiyom sağlığı ve hastalıkları yaşlanmayı temel olarak etkileyebilir (Zapata ve Quagliarello, 2015). Rodentler ile yapılan çalışmalarda elde edilen deneysel kanıtlar, mikrobiyomun nörodejenerasyonun ilerlemesini etkileyebileceğini göstermiştir (Sampson ve ark., 2016). Ayrıca, mikrobiyom bileşimini olumlu yönde değiştirebilen probiyotiklerin ve prebiyotiklerin insanlarda intestinal sağlığı ve sistemik inflamasyonu olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir (Patel ve ark., 2014; Vaiserman ve ark., 2017).

Köpeklerin mikrobiyom bileşiminin fare ve domuzların mikrobiyom profiline kıyasla insanlardaki bileşime daha fazla benzediği gösterilmiştir (Coelho ve ark., 2018) ve aynı evi paylaşan köpeklerin ve insanların mikrobiyomları arasındaki korelasyonlar da bildirilmiştir (Misic ve ark., 2015).

Yaş, mikrobiyal çeşitliliğin azalmasıyla bağırsak mikrobiyotasında önemli değişikliklere yol açan faktörlerden birisidir. Organizma yaşlandıkça immün ve inflamatuvar yaşlanma sürecinden geçmektedir ve bu süreçte bağırsak mikrobiyotası da diyet, fiziksel aktivite ve ilaç kullanımı ile progresif bir değişikliğe uğramaktadır (Yatsunenko ve ark., 2012). Köpeklerde de yaşla birlikte, bağırsak mikrobiyom çeşitliliğinde azalma ve laktobasilli artışı yaygın bulgular arasındadır (Mizukami ve ark., 2019).

İnsanlarda yapılan çalışmalar disbiyozisin yaşlılığa bağlı problemlerin ortak noktası olduğunu vurgulamaktadır (GBD, 2018). İnsanlarda yaşa bağlı disbiyozis (microb-aging) durumunda *Clostridiales* ve *Bifidobacterium*'da kayıpların olduğu, *Proteobacteria*'da zenginleşme gözlemlendiği ve *Enterobacteriaceae* gibi pathobiontların temsilinin arttığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (O'Toole ve Jeffery, 2015; Xu ve ark., 2019; Jeffery ve ark., 2016; Bosco ve Noti, 2021).

1.6.4. Biliş ve Davranışsal Açıdan Şekillenen Değişiklikler

Yaşlanma ile birlikte yukarıda bahsedildiği gibi, neoplazi, kardiyovasküler hastalıklar, böbrek/idrar yolu hastalıkları, karaciğer hastalıkları, diyabet, eklem/kemik rahatsızlıkları ve halsizlik gibi tıbbi sorunlar görülebilmektedir ve davranış değişiklikleri bu hastalıkların erken belirtisi olabilmektedir.

Yaşa bağlı davranış değişiklikleri bir süreklilik içinde meydana gelir ve fizyolojik yaşlanma sürecinin patolojik yaşlanmadan nasıl ayırt edilmesi gerektiği konusunda çok fazla tartışma mevcuttur. Köpeklerde yaşa bağlı şekillenen değişiklikler, dikkat (Wallis ve ark., 2014), problem çözme (González-Martínez ve ark., 2013) ve reversal öğrenme (Mongillo ve ark., 2013) gibi bilişin farklı yönlerini ölçen çeşitli davranış testleri aracılığıyla tanımlanmıştır. Bu sonuçların çoğu, bilişsel fonksiyon bozukluğu belirtileri gösteren köpekler dikkate alınmayıp yalnızca sağlıklı ama senyör köpekler, genç köpekler ile karşılaştırıldığında performanslarında azalmayı işaret etmektedir. Bununla birlikte, doğrudan davranışsal ölçümlere dayalı olarak normal yaşlanma belirtileri veya erken bilişsel fonksiyon bozukluğu belirtileri gösteren köpekler arasında ayırım yapmanın oldukça zor olduğu kanıtlanmıştır (Landsberg ve Malamed, 2017; Rosado ve ark., 2012).

Senyör köpeklerde yaşlanma ile birlikte en sık gözlenen davranış problemlerinin araştırıldığı çalışmalarda genel olarak şu davranış sorunları gözlenmektedir: ayrılık stresi (%29), insanlara karşı agresyon (%27), uygunsuz idrar ve dışkı yapma (%23), aşırı vokalizasyon (%21), fobiler (%19), uyku-uyanıklık döngüsünde değişiklikler (%8), bilişsel fonksiyon bozukluğu (%7), kompulsif veya tekrarlayan davranışlar (%5) ve tür içi agresyon (%5) (Landsberg ve Ruehl, 1997).

1.6.5. Yaşlı Köpeklerde Davranış Değişikliklerinin Nedenleri

Yaşlanma sürecinin fiziksel, metabolik ve duygusal değişimleri nedeniyle, yaşlı evcil hayvanlar, genç evcil hayvanlara göre daha fazla davranış problemi

yaşama eğilimindedir ve bu sorunların çoğunun nedeni genç evcil hayvanlardan farklılık göstermektedir.

1.6.5.1. Medikal Durumlar

Özellikle osteoartrit, neoplazi, ensefalopati ve dental hastalıklar gibi ağrılı durumlar artan agresyona veya sosyal etkileşimde azalmaya neden olabilir. Endokrinopatiler, katarakt ve duyma kaybı, evcil hayvanın çevresiyle etkileşim biçiminde derin değişikliklere neden olabilir. Yaşlanan evcil hayvanın aktivite düzeyi, eliminasyon paterni ve uyku-uyanıklık döngüsü böbrek, kalp ve sindirim sistemindeki hastalıklardan kaynaklanabilir. Kemik, merkezi sinir sistemi, gastrointestinal sistem, prostat, meme bezi ve intranazal, intratorasik, abdominal, oral ve faringeal bölgelerdeki tümörler sıklıkla agresyon, irritabilite, azalmış sosyal etkileşim ve vokalizasyon gibi ağrı ve ağrı kaynaklı davranışlarla ilişkilidir (Landsberg ve Malamed, 2017).

1.6.5.2. Yaşa Bağlı Yaygın Olarak Gözlenen Davranış Değişiklikleri

Kaslarda ve organ sistemlerinde şekillenen dejenerasyon, yaşlanan vücuttaki enerji rezervlerinin eksikliği ve adaptif kapasitedeki kayıp, yaşlanan evcil hayvana spesifik medikal patolojilerinden ayrı ve farklı davranışsal değişiklikler olarak yansıyabilir. Yaşlı evcil hayvanda letarji, iştahta azalma, aktivitede azalma ve yalama veya kemirme gibi oral aktivitelerin sıklığında azalma yaşlanma sürecinin doğal bir parçası olabilir (Landsberg ve Malamed, 2017; Rajapaksha, 2018).

1.6.5.2.1. Stresle İlişkili Davranışlar

Stresli durumlara karşı gelişen adaptasyon, yaşlanma ile birlikte azalmaktadır. Rutin aktivite, uyku-uyanıklık döngüsü ve sosyal etkileşimdeki değişiklikler; su ve/veya mama tüketiminde azalma; artan titreme, evcil hayvan

sahipleri tarafından not edilen stresle ilgili yaygın olarak gözlenen davranış değişiklikleridir. Benzer şekilde, vokalizasyon, agresyon veya apati, artan hassasiyet, depresyon, ev içine idrar yapma, azalan oyun aktivitesi, fobi ve ayrılık stresi, her yaşta evcil hayvanda görülebilen stresle ilişkili bazı belirgin davranış değişiklikleridir (Landsberg ve ark., 2011).

1.6.5.2.2. Çoklu Faktörlerin Etkisi

Yaşlanan evcil hayvanlarda aynı anda birden fazla medikal problem şekillenebilmektedir. Örneğin, osteoartrit ve duyma kaybı yaşayan bir köpek, bu problemlerden yalnızca birine sahip köpeğe kıyasla daha agresif bir tavır sergileyebilir. Ayrıca, hayvan sahibi tarafından göz ardı edilen bazı davranış problemleri, hastalık durumuyla birleştiğinde belirgin ve dayanılmaz bir hale gelebilir. Örneğin; tuvalet eğitimi olmayan bir evcil hayvanın ev içine uygunsuz idrar yapması, böbrek hastalığı varlığında gitgide kötüleşen bir problem haline gelebilir.

1.6.5.2.3. Primer (Medikal Olmayan) Davranış Problemleri

Yaşlanan evcil hayvanlar sosyal veya çevresel değişimleri daha az tolere edebildikleri için gençken olduğundan daha kolay bir şekilde primer davranış problemleri geliştirebilir. Yeni bir eve taşınmak, aileden birisinin kaybı (kişi veya evcil hayvan), rutindeki değişiklikler ve eve yeni bir canlının katılması (kişi veya evcil hayvan) gibi değişikliklerin, genç bir hayvana kıyasla yaşlılarda davranış problemlerini tetikleme ihtimali daha yüksektir. Bu nedenle, evcil hayvanlar yaşlandıkça agresyon, kaygı ve korkuya dayalı durumlar ve fobiler gibi primer davranış problemleri gelişebilir (Rajapaksha, 2018).

1.6.6. Köpeklerde Bilişsel Fonksiyon Bozukluğu

Köpeklerde bilişsel fonksiyon bozukluğu (Canine Cognitive Dysfunction, CCD), insanlarda görülen Alzheimer hastalığının bir analogu niteliğindedir. CCD yaşlı köpeklerde, özellikle de 8 yaşından büyük senyör köpeklerde yaygın olarak görülmektedir. Yavaş şekilde ilerleme gösteren, değişen mental aktivasyon ve demans belirtileri ile karakterizedir (Dewey ve ark., 2019).

CCD'li köpek ve kedilerin beyinlerinde çeşitli mikroskobik ve makroskopik değişiklikler tanımlanmıştır. Bunlar, hipokampusta ve serebral kortekste amiloid- β ($A\beta$) plaklarının birikimi, arteriyoskleroz ve infarkt oluşumu dahil olmak üzere çeşitli perivasküler değişiklikleri içermektedir. $A\beta$ proteini, CCD'li köpeklerin ve AD'li kişilerin beyinlerinde birikim gösteren ve beyin parankiminde plaklar oluşturan nörotoksik bir proteindir. Plazma $A\beta$ seviyesinin ölçümü insanlarda Alzheimer hastalığının teşhisinde kullanılan bir yöntemdir. Köpeklerde bu belirtecin kullanımı ile ilgili bir çalışmada, genç köpeklerin yaşlı, bilişsel fonksiyon bozukluğu gösteren köpeklere oranla önemli ölçüde daha yüksek $A\beta$ 1-42 ve $A\beta$ 1-40 plazma seviyelerine sahip olduğu bulunmuştur. Köpeklerde plazma $A\beta$ konsantrasyonlarını değerlendiren bir başka çalışmada gruplar arasında $A\beta$ 40 seviyeleri veya $A\beta$ 42 / $A\beta$ 40 oranında anlamlı bir fark bulunamadığı vurgulanırken, plazma $A\beta$ 42 seviyesinin, CCD köpek gruplarında, hafif bilişsel bozukluk (Mild Cognitive Impairment, MCI) ve CCD olmayan gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu ve bu değer CCD için bir belirteç olabileceği düşünülmektedir (González-Martínez ve ark., 2011; Landsberg ve Malamed, 2017; Rajapaksha, 2018).

Bilişsel fonksiyon bozukluğu gösteren hayvanlar, tipik olarak şu davranış değişikliklerini göstermektedir: spasyal disoryantasyon (örneğin; ev içinde veya bahçede kaybolma veya bazı nesnelerin etrafından dolanarak geçememek, sıkışmak), sosyal etkileşimlerde değişiklik (örneğin; sahibini tanımıyor gibi davranma), uyku-uyanıklık döngüsünde bozulma, uygunsuz işeme davranışı sergileme ve aktivitede şekillenen değişiklikler. Aktivitedeki değişiklikler, artan veya tekrarlayan bir

davranış, azalan aktivite veya depresyon ve/veya kaygıyla ilgili davranışlar olarak yansıyabilmektedir (Landsberg ve Malamed, 2017; Rajapaksha, 2018).

CCD'nin davranışsal olarak ayırıcı tanısı arasında yer alan “anksiyete” oldukça önemli bir problemdir. Anksiyete, olumsuz veya tehlikeli bir durumun olabileceğine dair huzursuzluk veya endişe duygusudur, çoğu zaman belirsizdir ve geçmiş deneyimlere dayanmaz. Belirli durumlarda ortaya çıkabilir (örneğin, sahibi evden çıkmak üzereyken) (Landsberg ve ark., 2001). Anksiyetenin davranışsal ve fizyolojik belirtileri büyük ölçüde serotonin ve noradrenalin (hem merkezi hem de periferik sinir sistemi) tarafından modüle edilir.

Kronik anksiyete, efektif öğrenme ve bellek konsolidasyonu için gerekli olan nörotransmitterlerin üretiminde azalmaya yol açabilir. Bu nörotransmitterler arasında serotonin, dopamin ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör (Brain Derived Neurotrophic Factor, BDNF) vardır. Serotonin ve BDNF'nin, öğrenme için olduğu kadar nörogenesis ve sinaptik plastisitenin indüklenmesi için de oldukça önemli olduğu bilinmektedir (Gould, 1999). Dopamin, hipokampusta bellek konsolidasyonu için önemli bir rol üstlenmektedir. Bu nedenle, kronik anksiyetesi olan evcil hayvanlar, anksiyete sırasında bellekte veya önceden öğrenilmiş davranışlarda eksiklikler gösterebilir ve yeni şeyleri öğrenmede güçlük yaşayabilir (Landsberg ve Araujo, 2005).

BDNF kan-beyin bariyerini geçebilir ve serum ve plazmadaki seviyelerinin beyin omurilik sıvısındaki BDNF seviyeleri ile yüksek derecede ilişkili olduğu bulunmuştur (Pan ve ark., 1998). Rodentlerde ve insanlarda yapılan çalışmalar, stres ve glukokortikoid maruziyetinin hipokampusta ve prefrontal kortekste BDNF ekspresyonunu azalttığını ve majör depresif bozukluğu (MDD) olan insanlarda yapılan postmortem çalışmalarda BDNF seviyelerinin azaldığını göstermiştir (Duman ve Duman, 2015). İnsanlarda yapılan bir meta analize göre, depresyon gibi psikiyatrik rahatsızlığı olan hastalarda periferik serum ve plazma BDNF düzeylerinin düşük olduğu belirlenmiştir (Molendijk ve ark., 2014).

2019 yılında davranış problemi olan köpeklerde periferik BDNF seviyesinin ölçümünün yapıldığı bir çalışmada (Moesta ve ark., 2019) ayrılık stresinden etkilenen köpeklerdeki serum BDNF düzeylerinin, etkilenmeyen köpeklerin serum BDNF düzeylerine kıyasla daha düşük olduğu bulunmuştur. Genç ve yaşlı köpekler arasındaki serum BDNF düzeyini araştıran bir başka çalışmada da BDNF konsantrasyonlarının iki grup arasında farklı olmadığı gösterilmiştir (Isaka, 2022). Tüm bu bilgilerden yola çıkarak yaşlılıkla birlikte artan kaygı seviyesi göz önüne alındığında BDNF seviyesinde şekillenen değişiklik önem arz etmektedir.

1.6.7. Yaşlı Köpeklerde Ağrının Davranışsal Değişiklikler ile İlişkisi

Ağrıya yol açan neredeyse bütün hastalık süreçleri, evcil hayvanların davranışını etkilemektedir. Hem akut hem de kronik ağrı, artan irritabilite, aktivite düzeylerinde değişiklikler, oyun oynamada isteksizlik ve agresyona yol açabilmektedir (Camps ve ark., 2012). Evcil hayvan, tehdit edici veya ağrı verici tetikleyicilerden kaçınmayacağını öğrendiği için ağrı, artan anksiyete ve korkuya sebep olabilir. Köpekler, ağrı bulgularını (topallama, belli bir bölgeyi yalama ve vokalizasyon gibi) kedilere göre daha belirgin şekilde gösterme eğilimindedir. Artriti olan kediler ve köpekler, sahipleriyle etkileşim kurmayı veya yürüyüşe çıkmayı reddedebilir. Aynı zamanda artriti olan hayvanlar, ağrılı bölgeyi yalamak gibi tekrarlayan davranış geliştirebilir (Frank, 2014). Lokal endorfinlerin, enkefalinlerin ve opioidlerin salınması bu davranışı daha da güçlendirebilir ve sürdürülmesine yol açabilir. Ağız ve diş ağrısı, gastrointestinal ağrı iştahın azalmasına, etkileşimden kaçınmaya veya başı okşanmaya çalışıldığında agresyona neden olabilir. Ağrı ayrıca uyku süresini ve kalitesini azaltabilir ve bu durum da evcil hayvanların daha sinirli ve hassas olmasına yol açabilir (Landsberg ve Malamed, 2017).

1.7. Çalışmanın Amacı

Ülkemizde özellikle salgın hastalık riskinden dolayı hayat boyu sürdürülen ve yıllık tekrarlı aşılamaı içeren bir aşı takvimi uygulanmaktadır. Yürütölen bu aşılama prosedürünün immun sistem, sinir sistemi ve sindirim sistemi arasındaki etkileşimi ve yaşlı köpeklerde hayat boyu yıllık aşı uygulamalarının özellikle CCD gibi nörodejeneratif hastalıklara, kaygı durumuna ve bağırsak mikrobiyotası üzerine olan etkisi bilinmemektedir.

Bu araştırma senyör köpeklerde hayat boyu sürdürölen tekrarlı aşılamanın bilişsel fonksiyon bozukluğu, kaygı durumu ve sindirim sistemi mikrobiyotası üzerine etkilerini incelemek üzerine tasarlanmıştır.

Planlanan bu tez çalışması, köpeklerde belirli bir yaş üzerinde düzenli olarak uygulanan aşılarn kalın bağırsak mikrobiyota profilini değıştirdiğı, beyin fonksiyonlarını etkileyerek CCD gelişiminde ve anksiyeteye yatkınlıkta rol oynadığı hipotezi ile kurgulanmıştır.

Bu projenin birincil amacı senyör köpeklerde aşı uygulama yaşı ve sıklığının beyin ve kalın bağırsak mikrobiyotası üzerine etkilerinin ortaya konulmasıdır. Senyör köpeklerde kalın bağırsak mikrobiyota profilleri ortaya konularak davranış profilleri ve bilişsel fonksiyon bozukluğu ile ilişkilendirme yapılması hedeflenen çalışma çerçevesinde ayrıca yaşlı köpeklerde ağrı durumu ve yaşam kalitelerinin değıerlendirilmesine yönelik uygulamalar da gerçekleştirilmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı tarafından 04.03.2020 tarihli toplantı ve 2020-5-38 karar numarası ile onaylanarak etik kurallara uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

2.1. Gereç

2.1.1. Örneklem Seçimi ve Demografik Bilgi

Çalışmanın örneklem grubunu 8 yaş ve üzeri her iki cinsiyetten toplam 20 adet köpek oluşturmaktadır (Çizelge 2.1). Köpekler aşılama durumlarına göre iki gruba ayrılmıştır:

Grup 1 (n:10): En az 3 yıl önce aşılanmış 8 yaş ve üzeri köpekler

Grup 2 (n:10): Temel aşıları yıllık olarak uygulanmış 8 yaş ve üzeri köpekler

Çizelge 2.1. Çalışmaya Katılan Köpeklerin Demografik Bilgileri.

No	Grup	İrk	Cinsiyet	Yaş	İsim
1	1	Labrador Retriever	Dişi	9	Bel.
2	1	Labrador Retriever	Erkek	9	Smi.
3	1	Alman Çoban Köpeği	Dişi	14	Ali.
4	1	Golden Retriever	Dişi	10	Mi.
5	1	Terrier Alex	Erkek	8	Ale.
6	1	Melez	Dişi	14	Mic.
7	1	Beagle	Dişi	13	Par.
8	1	Rottweiler	Erkek	10	Hay.
9	1	Melez	Dişi	12	Dor.
10	1	Pug	Dişi	13	Sus.
11	2	Melez	Dişi	13	Ner.
12	2	Golden Retriever	Erkek	14	Tar.
13	2	Melez	Erkek	8	Bar.
14	2	Melez	Dişi	9	Bad.
15	2	Golden Retriever	Dişi	8	Bl.
16	2	Pitbull	Dişi	9	Lat.
17	2	Terrier	Erkek	10	Boz.
18	2	Terrier	Dişi	10	Opr.
19	2	Cocker Spaniel	Dişi	13	Sho.
20	2	Golden Retriever	Dişi	8	Fın.

Araştırmaya Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi'ne ve özel veteriner kliniklerine başvuran çalışmaya katılmaya gönüllü hayvan sahiplerine ait klinik olarak herhangi bir sağlık problemi olmayan köpekler dahil edilmiştir. Davranış analizleri ve kan-dışkı alım prosedürlerinin tamamı hem köpeklerin refahı hem de çalışma verilerinin güvenilirliği göz önüne alınarak kendi ev ortamlarında yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen tüm köpeklerin sahiplerine yapılacak olan tüm analizler için aydınlatılmış onam formu imzalatılarak onayları alınmıştır.

Çalışma için başvuran köpeklerin tamamına rutin klinik muayene, tam kan ve serbest T4 testi yapılmıştır. Köpeklerin ayrıca nörolojik muayeneleri ve duysal muayeneleri (görme-işitme testleri) gerçekleştirilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Davranışsal Değerlendirme

Çalışmaya katılan senyör köpeklere bilişsel durumu değerlendirmek amacıyla “Nesne Seçim Testi” yapılmıştır. Köpeklerde lateralizasyonun stresle olan ilişkisi göz önüne alındığında pati tercihini belirlemek ve problem çözme yeteneğini değerlendirmek amacıyla “Mamaya Ulaşım Testi”nin yapılması planlanmıştır. Davranış testlerinin optimizasyon çalışmaları sırasında test esnasında köpeklerin özellikle ayağa kalkarken veya yere eğilirken zorlandıkları, teste olan motivasyonlarının ise düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durum göz önünde bulundurularak daha önce yaşlı köpeklerde kullanım etkinliği gösterilmiş olan (Barnard ve ark., 2017) ve serebral asimetrisinin gücünü belirlemek için standart bir test olan KONG testinin kullanılmasına karar verilmiştir.

2.2.1.1. Nesne Seçim Testi

Nesne seçim testinde köpeklerin ödül mamasını elde etmek için iki farklı nesneden birini seçmesi gerekmektedir. Bu araştırma kapsamında köpeklerin

tamamına nesne seçim testi uygulanmıştır. Analiz sonuçları “Performans = karar verme süresi x seçim başarısı” kriteri göz önüne alınarak skordama sistemine göre yapılmıştır.

Uygulanan nesne seçim testinin prosedürü aşağıda sunulmaktadır:

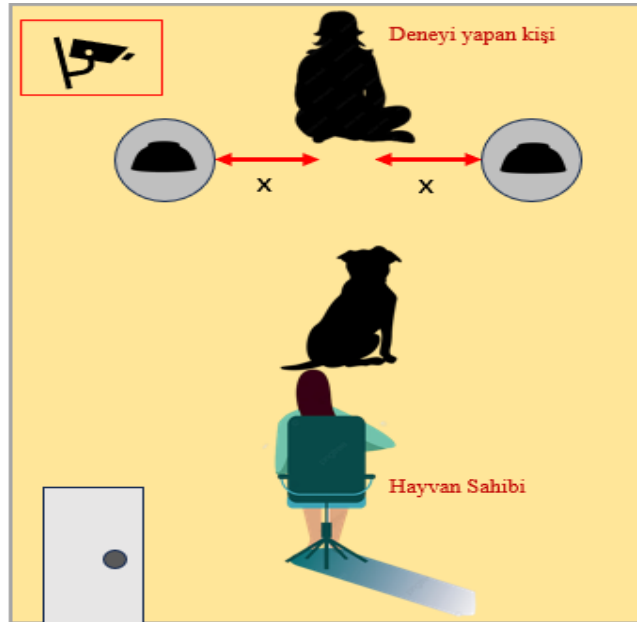
1. Aynı renkte, büyüklükte, şekilde ve mat olan iki nesne (kase) boş bir a4 kağıdın ortasına, düz bir zemin üzerine aynı hizada ve ters çevirerek koyulur.
2. Nesnelerden birinin altına köpeklerin sevdiği bir mama/ödül koyulur. Bu aşamada köpeklerin ödülü hangi taraftaki nesnenin altına koyulduğunu görmesi önemlidir.
3. Ödülü ilk aşamada hep aynı nesnenin altına koymak gerekmektedir (örn. hep sağ taraftaki kaseyi). Köpeklerden ödül mamasının olduğu kaseye doğru yönelmesi, sonrasında kaseye burnu veya patisiyle dokunması beklenmektedir. Beş tekrar olacak şekilde bu işlem sürdürülür. Köpeklerin iki seçim yapmalarına izin verilmektedir. Köpeğin boş kaseye gitmesi durumunda ilgili aşama sonlandırılmaktadır.
4. Daha sonra nesne seçim testinin ikinci aşamasına geçilir. Bu aşamada çalışmaya katılan köpeklerden beklenen şey ödül maması olmadan ilk aşamada ödül maması konulan taraftaki nesneye doğru gitmesidir (Örneğin ilk aşamada sağ taraftaki kaseyi altına ödül konulduysa bu aşamada da mama olmadan sağ taraftaki nesneye doğru gitmesi gerekmektedir). Bu aşama da beş tekrar olacak şekilde sürdürülür.
5. Son olarak uzun süreli belleği test etmek amacı ile tüm bu işlemler 15 dakika sonra tekrar edilir.

Nesne seçim testinin optimizasyonu sırasında, örneklem grubunu oluşturan köpeklerin testleri ilk olarak Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Davranış Kliniği’nde gerçekleştirilmiştir. Testlerin optimizasyon çalışması (Şekil 2.1) sırasında vücut dili sinyalleri köpeklerin stresli olduğunu gösterdiği için köpeklerin refahı ve daha güvenilir veriler elde edilmesi açısından testlerin ev ortamında yapılmasının daha doğru olacağına karar verilmiştir.



Şekil 2.1. Nesne Seçim Testinin Optimizasyon Çalışması.

Sonuç olarak nesne seçim testi çalışmaya katılan köpeklerin kendi ev ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Test prosedürünün tamamı video kamera (Go Pro Hero 6) ile kayıt altına alınmıştır. Test sırasında, özellikle köpekler iki nesne arasında seçim yaparken hasta sahiplerinin köpeklerini yönlendirmesine izin verilmemiştir. Deneyi yapan kişi, sağ ve sol tarafında bulunan nesnelerin arkasında ve her iki nesnenin tam ortasında olacak şekilde konumlanmıştır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Testin yapıldığı ortamının şeması.

Performans değerlendirmesi için yapılan skorlamada, köpeklerin tüm test aşamalarında performans sergilemeleri ve en son aşamaya kadar gelmeleri kriteri baz alınmıştır. Tüm test prosedürü kendi içerisinde 1-1, 1-2, 2-1 ve 2-2 olmak üzere 4 aşamaya ayrılmıştır. 1-1 ilk olarak gerçekleştirilen ve nesne seçim testinin ödül maması konulan aşamasını, 1-2, 1-1’den sonra yapılan ve ödül maması içermeyen test aşamasını, 2-1 ilk aşama sona erdikten 15 dakika sonra tekrar edilen ve ödül maması kullanılan aşamayı, 2-2 ise nesne seçim testinin son aşaması olan ve 2-1 aşamasından hemen sonra gerçekleştirilen ödül maması kullanılmadan yapılan aşamayı ifade etmektedir. Her bir aşama için performans gösteren tüm köpeklere “1” puan verilmiştir. En son aşamada (2-2) performans gösteren köpeklere + 1 puan verilerek toplam skor hesaplanmıştır.

Solomon Coder Programı ile Davranış Analizi:

Solomon Coder programı, çeşitli davranışların kodlanması için tasarlanmış olan ücretsiz bir yazılımdır. Çalışma kapsamında kullanılmış olan program “Beta 19. 08. 02” versiyonudur (<https://solomon.andraspeter.com/download.php>). Bu program ile yapılan kodlama, analiz edilmek istenen davranışsal paternlere göre değişiklik göstermektedir. Test edilen köpeklerin nesne seçim testi sırasında çekilen videoları kullanarak, ilk olarak davranışsal paternleri ve kategorileri içeren konfigürasyon dosyası oluşturulmuştur (izelge2.2).

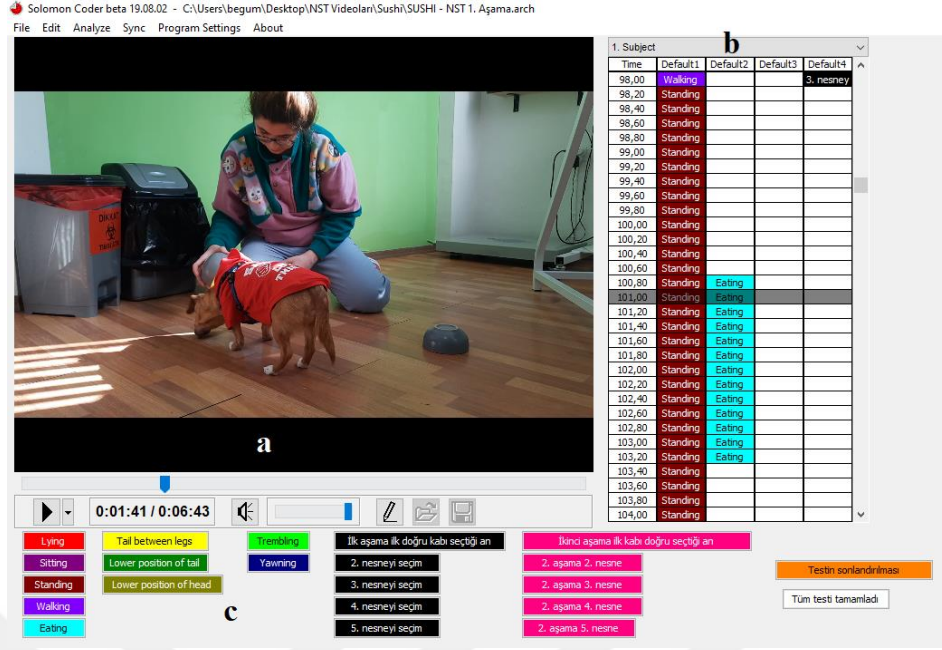
Çizelge 2.2. Konfigürasyon Tablosu.

Davranış	Tanım	Solomon Coder Analizi
Oturma	Kalası üzerinde oturma	Manuel
Uzanma	Kalası ve karnı yere temas ederek yatmak	Manuel
Ayakta Durma	Dört ayağı üzerinde hareketsiz bir şekilde ayakta durma	Manuel
Yürüme	Testin yapıldığı alanda yürümek	Manuel
Başı düşük pozisyonda tutma	Başın alçak pozisyonda tutulması	Manuel
Kuyruğu düşük pozisyonda tutma	Kuyruğun nötr pozisyondan daha aşağıda tutulması	Manuel
Kuyruğun bacakların arasında tutma	Kuyruğun bacakların arasında tutulması	Manuel

Çizelge2.2. Devam. Konfigürasyon Tablosu.

Eslemek		Manuel
Başın ve vücudun titremesi		Manuel
Yemek yemek		Manuel
İlk aşamada doğru nesneyi ilk seçtiği an	Nesne seçim testinin ilk aşamasında altında mama bulunan nesneye doğru yönelmesi, burnunun veya patisinin nesneye temas etmesi	Manuel
İlk aşamada doğru nesneyi ikinci kez seçtiği an	Nesne seçim testinin ilk aşamasında ikinci kez altında mama bulunan nesneye doğru yönelmesi, burnunun veya patisinin nesneye temas etmesi	Manuel
İlk aşamada doğru nesneyi üçüncü kez seçtiği an	Nesne seçim testinin ilk aşamasında üçüncü kez altında mama bulunan nesneye doğru yönelmesi, burnunun veya patisinin nesneye temas etmesi	Manuel
İlk aşamada doğru nesneyi dördüncü kez seçtiği an	Nesne seçim testinin ilk aşamasında dördüncü kez altında mama bulunan nesneye doğru yönelmesi, burnunun veya patisinin nesneye temas etmesi	Manuel
İlk aşamada doğru nesneyi beşinci kez seçtiği an	Nesne seçim testinin ilk aşamasında beşinci kez altında mama bulunan nesneye doğru yönelmesi, burnunun veya patisinin nesneye temas etmesi	Manuel
İkinci aşamada doğru nesneyi ilk seçtiği an	Nesne seçim testinin ilk aşamasında altında mama bulunan fakat ikinci aşamasında altında mama bulunmayan nesneye doğru yönelmesi, burnunun veya patisinin nesneye temas etmesi	Manuel
İkinci aşamada doğru nesneyi ikinci kez seçtiği an	Nesne seçim testinin ilk aşamasında altında mama bulunan fakat ikinci aşamasında altında mama bulunmayan nesneye doğru yönelmesi, burnunun veya patisinin nesneye temas etmesi	Manuel
İkinci aşamada doğru nesneyi üçüncü kez seçtiği an	Nesne seçim testinin ilk aşamasında altında mama bulunan fakat ikinci aşamasında altında mama bulunmayan nesneye doğru yönelmesi, burnunun veya patisinin nesneye temas etmesi	Manuel
İkinci aşamada doğru nesneyi dördüncü kez seçtiği an	Nesne seçim testinin ilk aşamasında altında mama bulunan fakat ikinci aşamasında altında mama bulunmayan nesneye doğru yönelmesi, burnunun veya patisinin nesneye temas etmesi	Manuel
İkinci aşamada doğru nesneyi beşinci kez seçtiği an	Nesne seçim testinin ilk aşamasında altında mama bulunan fakat ikinci aşamasında altında mama bulunmayan nesneye doğru yönelmesi, burnunun veya patisinin nesneye temas etmesi	Manuel
Testin sonlandırılması	Nesne seçim testinde altında mama bulunmayan veya daha önce tercih etmediği kaba doğru yönelmesi, burnunun, patisinin doğru olmayan nesneye temas etmesi veya teste karşı ilgisinin olmaması durumu	Manuel

Solomon Coder programı temel olarak üç bileşenden oluşmaktadır; video oynatıcı, konfigürasyon tablosu ve davranışsal patern butonları (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Solomon Coder Ekranı (a: video oynatıcı, b: konfigürasyon tablosu, c: davranışsal patern butonları).

2.2.1.2. KONG Testi

KONG oyuncacı köpeklerde özellikle mental aktiviteyi sağlamak amacıyla sıklıkla önerilen ve kullanılan bir üründür. Bilimsel olarak bu oyuncak hayvanlarda problem çözme ve stres gibi davranışların altında yatan sebepleri araştıran çalışmalarda ve lateralizasyon çalışmalarında tercih edilmektedir.

Çalışmaya katılan köpeklerin problem çözme yetileri hakkında fikir sahibi olmak ve pati tercihlerini belirlemek amacıyla KONG testi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla köpeklerin boyutuna uygun olan kong oyuncacı tercih edilerek, test öncesi oyuncak yaş mama ile doldurulmuştur. Kong testinin değerlendirilmesinde ilk pati yönü göz önünde bulundurulmuştur (Salgirli Demirbas ve ark., 2023) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Ev Ortamında KONG testi.

2.2.1.3. Mini C-BARQ Analizi

C-BARQ (Canine Behavioral Assessment & Research Questionnaire) güncel olarak toplam 14 alt başlık ve ayrıca çeşitli davranış problemlerinin yer aldığı 100 sorudan oluşan, köpeklerin mizaç, davranış özellikleri ve problemlerinin incelenmesi için oluşturulmuş standart bir ankettir (Duffy ve Serpell, 2012; Hsu ve Serpell, 2003).

Ankette yer alan alt başlıklar; uyarılma-heyecanlanma durumu, yabancılara karşı agresyon, köpeklere karşı agresyon, sahibine karşı agresyon, yabancılara karşı korku, köpeklere karşı korku, sosyal olmayan korku, temasa yönelik hassasiyet, köpekler arasında rekabet, ayrılık ile ilişkili problemler, eğitilebilirlik, bağlanma-dikkat çekme davranışı, kovalama, enerji ve kuyruk kovalama, hiperaktivite, yalnız kaldığında ürinasyon-defekasyon gibi durumlarla ilgili soruların yer aldığı çeşitli problemleri içermektedir.

Çalışma kapsamında mini C-BARQ kullanılmasının temel sebebi hasta sahiplerine anket formunu doldurma kolaylığı sağlamaktır. Mini C-BARQ anketi Duffy ve ark. (2014) tarafından geliştirilmiştir. Söz konusu çalışmada araştırmacılar, büyük bir örneklem grubu kullanarak Cronbach's alfa katsayısını hesaplamışlardır.

Çalışma sonucunda, mini C-BARQ’ın orijinal C-BARQ ile korele ve tutarlı olduğu sonucuna varılmıştır. C-BARQ’a göre daha kısa sürede tamamlanmasına karşın C-BARQ ile tutarlı veriler elde etme imkanı sunması açısından mini C-BARQ anketi araştırmaya destek verilerinin oluşturulması için tercih edilmiştir.

2.2.1.4. Bilişsel Fonksiyon Bozukluğu Değerlendirme Anketi

Araştırma kapsamında köpeklerin mental durumunu değerlendirmek amacıyla tasarlanmış ve hem hasta sahipleri hem de veteriner hekimler tarafından CCD’nin teşhis edilmesini kolaylaştıran anket çalışmaları kullanılmıştır.

Bu anket çalışmalarından ilki Gary Landsberg tarafından geliştirilen ve CCD’nin tipik ve ana semptomları olan disoryantasyon, sosyal interaksyonda şekillenen değişiklik, uyku-uyanıklık düzenindeki değişiklik, uygunsuz eliminasyon, öğrenme, bellek, aktivite ve anksiyete başlıklarını içeren ve akronim olarak isimlendirilen “DISHAA (Köpeklerde Bilişsel Fonksiyon Bozukluğu Değerlendirme Anketi)”dır (Şekil 2.5).

Bölüm 5/8

1. Köpeklerde Bilişsel Fonksiyon Bozukluğu Değerlendirme Anketi - DISHAA

Köpeklerde şekillenen "Bilişsel Fonksiyon Bozukluğu Sendromu (CCDS)", insanlarda Alzheimer hastalığına benzer şekilde, genellikle yaşlanmayla birlikte ortaya çıkan ve ilerleyici bilişsel bozuklukla karakterize, geri dönüşü olmayan bir beyin dejenerasyonudur. Bilişsel fonksiyon bozukluğu sendromunun başlangıcı yavaştır, yönetilmesi zor olabilir ve 8 yaş ve üzeri köpeklerle yapılan çalışmalara göre köpeklerin %14'ünü etkilemektedir. Bir köpeğe bilişsel fonksiyon bozukluğu sendromu teşhisi konulabilmesi için, sahiplerinin köpeklerinin belirli davranışları sergilediğini gözlemlemesi gerekmektedir.

Oryantasyon Bozukluğu

Bu anket formunun her bir aşamasında yakın geçmişte, köpeğinizin aşağıdaki davranışlardan her birini hangi ölçüde (0: Böyle bir davranış sergilemiyor, 3: Bu davranış şiddetli bir şekilde mevcut) gösterdiğini belirtmeniz istenmektedir.

*** Lütfen her bir soru için özellikle 7 yaş ve sonrasında ortaya çıkan veya ilerleyen belirtileri tanımlayınız.

0 1 2 3

Boyle bir davranış yok Hafif şiddetli mevcut Orta şiddetli mevcut Şiddetli derecede mevcut

Şekil 2.5. DISHAA Anketi.

Değerlendirme dahilinde ikinci bir anket olarak “Köpeklerde Bilişsel Bozukluğu Derecelendirme Ölçeği (CCDR-Canine cognitive dysfunction rating scale)” (Salvin ve ark., 2011) kullanılmıştır (Şekil 2.6). Bu ölçek, oryantasyonla ilgili sorunlar (boş boş bakma, evde kaybolma), bellek sorunları (sahipleri tanımama, evin kirletilmesi), ilgisizlik (aktivite süresinin azalması, sahiplerle temastan kaçınma), koku alma bozukluğu (yemek bulma zorluğu) ve hareketlilikle ilgili sorunlara odaklanmaktadır. Bu ölçeğe göre CCDR puanları 50'nin üzerinde olan yaşlı köpeklerin CCD'li olma ihtimalleri yüksektir. Bununla birlikte, kesin bir teşhis konulmadan önce insan demansında olduğu gibi, davranış değişikliklerinin diğer klinik nedenlerinin elimine edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle CCDR puanı >50 olan, veteriner hekim değerlendirmesinden geçmiş CCD'li köpekler için bu ölçek kesin ve standartlaştırılmış bir teşhis yöntemi olarak önerilmektedir.

Bölüm 6/8

2. Köpeklerde Bilişsel Fonksiyon Bozukluğu Değerlendirme Anketi - CCDRS

Bu bölüm 5. bölüme benzer şekilde köpeklerde bilişsel fonksiyon bozukluğunu teşhis etmek için rutin olarak kullanılan bir ölçekten oluşmaktadır. Bu bölümde yakın geçmişte, köpeğinizin aşağıdaki davranışlardan her birini hangi sıklıkta (1: asla, 5: > günde 1 kez) gösterdiğini belirtmeniz istenmektedir.

Resim başlığı

← 1 2 3 4 5 →
Asla Ayda 1 kez Haftada 1 kez Günde 1 kez > Günde 1 kez

Köpeğiniz ne sıklıkta ileri geri hareket ediyor, daireler çizerek dolaşıyor ve/veya herhangi bir amacı olmadan dolaşıyor? *

1 2 3 4 5

☐ ☐ ☐ ☐ ☐

Şekil 2.6. CCDRS Anketi.

2.2.1.5. Helsinki Kronik Ağrı İndeksi

Çalışmada köpeklerin ortopedik problemlerden kaynaklanan kronik ağrı durumunu değerlendirmek için “Helsinki Kronik Ağrı İndeksi (HCPI)” kullanılmıştır

(Şekil 2.7). Bu indeks osteoartrit kaynaklı kronik ağrı bulgusu gösteren köpekler için oluşturulmuştur.

Kronik Ağrı Değerlendirmesi - HCPI

Bu bölüm, köpeğinizdeki kronik ağrı durumunu değerlendirmek amacı oluşturulmuştur. Lütfen aşağıda belirtilen her bir durum için köpeğinizin gösterdiği davranışsal yanıtı en uygun olan seçeneği işaretleyiniz.

Köpeğinizin genel olarak tutumunu ve/veya ruh halini değerlendiriniz *

- ☐ Aşırı Tetikte
- ☐ Tetikte
- ☐ Ne tetikte ne de tam olarak ilgisiz
- ☐ İlgisiz
- ☐ Aşırı ilgisiz/halsiz

Köpeğinizin oyuna veya etkileşime katılma isteğini değerlendiriniz *

- ☐ Aşırı istekli
- ☐ İstekli
- ☐ İsteksiz
- ☐ Çok isteksiz
- ☐ Katılım göstermiyor veya hiç etkileşime girmiyor

Şekil 2.7. Helsinki Kronik Ağrı Skalası.

2.2.1.6. Yaşam Kalitesi (QOL) Ölçeği

QOL temel olarak evcil hayvanlarda gözlemlenebilir refah düzeyini yansıtmaktadır. Bu amaçla çalışmaya katılan köpeklerin yaşam kalitesi hakkında bilgi edinmek için köpek sahiplerine 7 ana başlık altında toplam 21 soru yöneltilmiştir. Bu ana başlıklar; mutluluk, mental durum, ağrı, iştah, hijyen, sıvı dengesi ve mobiliteden oluşmaktadır. Ölçeğin skorlandırılması likert ölçeğine göre yapılmıştır.

2.2.2. Hematolojik Analizler

Çalışma kapsamında köpeklerin sağlık durumunun iyi olduğunu belirleyebilmek adına tam kan ve serbest T4 analizi gerçekleştirilmiştir. Yapılan

hematolojik analizler için köpeklerden etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içeren pediatrik tüplere ve EDTA içermeyen tüplere (Hematube) kan örneği alınmıştır. Kan alım işlemi davranış testlerinde olduğu gibi köpeklerin ev ortamında gerçekleştirilmiştir. Alınan kan örneklerinde tam kan analizi kapsamında temel olarak beyaz kan hücre sayısı, lenfosit sayısı, kırmızı kan hücre sayısı, hemoglobin miktarı, hematokrit değeri ve platelet sayısı değerlendirilmiştir.

2.2.2.1. Tam Kan ve Serbest T4 (FT4) Analizi

Köpeklerde tam kan analizi için EDTA içeren pediatrik kan tüpleri kullanılmıştır ve analizler Rayto RT-7600 Vet hemogram cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

FT4 (Serbest T4) analizi için EDTA içermeyen kan tüpleri kullanılmıştır. Kan alınan kan tüpleri 2500 rpm devirde 10 dakika boyunca santrifüj edilerek 0,5 ml serum numunesi FT4 analizi için eppendorf tüpe aktarılmıştır. FT4 analizi kemilüminesans immunoassay ile (CLIA) gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.2. Serum BDNF Analizi

Köpeklerden alınan kan numunesi 2500 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir ve elde edilen 0,5 ml serum örneği eppendorf tüplere aktarıldıktan sonra analizin yapılacağı zamana kadar -20 °C'de saklanmıştır.

BDNF analizi Cloud Clone 96T, Canine BDNF ELISA kiti kullanılarak Sandwich ELISA yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Analizin Yapılışı:

1. Teste başlamadan önce tüm kit bileşenleri ve serum numuneleri oda sıcaklığına getirildi.
2. Standart 1,0 ml standart seyreltici ile sulandırıldı ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi sonra hafifçe çalkalandı.
3. Standartın stok solüsyondaki konsantrasyonu 10 ng/ml olduğu için 0,5 ml standart seyreltici içeren 7 adet tüp hazırlandı ve çift dilüasyon serisi oluşturuldu.
4. 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2,5 ng/ml, 1,25 ng/ml, 0,625 ng/ml, 0,312 ng/ml ve 0,156 ng/ml içeren seyreltilmiş standart bulunan 6 adet 5 ml'lik tüpler ve son tüp olarak da 0 ng/ml olan boş tüp hazırlandı. Yani stok standart dışında toplam tüp sayısı 7 olacak şekilde analize başlandı.
5. Deteksiyon A ve deteksiyon B stokları kullanılmadan önce santrifüj edildi. Sonra dilüasyon işlemine geçildi.
6. 20 ml yıkama solüsyonu konsantresi 580 ml distile su ile seyreltildi ve 600 ml 1×yıkama solüsyonu hazırlandı.
7. Dilüe edilmiş standart, kör ve numune için kuyucuklar belirlendi. Standart için 7 kuyucuk, kör için 1 kuyucuk hazırlandı.
8. Uygun kuyucuklara, kör ve numune dilüasyonlarının her birinden 100 µL eklendi. Plate kapatıcı ile kapatılarak 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
9. Her kuyucuktaki sıvı, yıkama işlemi yapmadan uzaklaştırıldı.
10. Bütün kuyucuklara 100 µl detektif A reaktifi eklendi ve kuyucuklar plate kapatıcı ile kapatıldı. 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
11. Multi kanallı bir pipet yardımı ile her kuyucuk 350 µl 1× yıkama solüsyonu ile yıkandı ve 1-2 dakika beklendi.
12. Plate emici bir yüzeye konularak tüm kuyucuklarda kalan sıvı çıkarıldı. Yıkama işlemi 3 defa tekrar edildi.
13. Her kuyucuğa 100 µl detektif B reaktifi eklendi, kuyucuklar plaka kapatıcı ile kapatıldı ve 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Ardından aynı şekilde yıkama işlemi gerçekleştirildi.

14. Ardından her kuyucuğa 90 µl substrat solüsyonu eklendi. Yeni bir plate kapatıcı ile kapatılarak 37°C'de 10-20 dakika inkube edildi. Bu inkübasyon zamanının 30 dakikayı geçmemesine dikkat edildi. Plate bu süreçte ışığa maruz bırakılmadı ve substrat solüsyonu eklendiğinde plate içindeki sıvı mavi renge döndü.
15. Kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu eklendi. Stop solüsyonu eklendiğinde sıvı sarıya döndü ve plate hafifçe karıştırıldı.
16. Ardından mikropate okuyucu çalıştırılarak 450 nm'de ölçüm yapıldı.

2.2.2.3. Flow Sitometri Analizi

Çalışma kapsamındaki köpeklerden alınan kan numunesinden elde edilen 0,5 ml serum örnekleri flow sitometri analizi yapılana kadar -20 °C'de eppendorf tüp içerisinde saklandı. Flow sitometri analizini gerçekleştirmek için kit olarak Biolegend-LEGENDplex™ Human Th1/Th2 Panel (8-plex) kullanıldı. Flow sitometri analizi Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nda Beckman Coulter Cytoflex cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

Reaktiflerin Hazırlanması:

1. İlk aşamada antikorla immobilize yakalama (capture) boncuklarının hazırlanması işlemi yapıldı.
2. Yıkama tamponu hazırlandı. 20×yıkama tamponu şişesi oda sıcaklığına getirildi ve saklama sırasında oluşabilecek tuz kristallerinin çözündürülmesi için karıştırıldı.
3. 25 ml 20×yıkama tamponu 475 ml deiyonize suyla seyreltildi.
4. Matriks hazırlandı. Bunun için test kiti içeriğinde bulunan liyofilize matriks bileşenini içeren şişeye 5 ml LEGENDplex™ test tamponu eklendi. 15 dakika inkübasyona bırakıldı ve ardından vortekslendi.
5. Standart hazırlandı. Bu amaçla liyofilize standart kokteyl 250 µl LEGENDplex™ tamponu ile sulandırıldı. Oda sıcaklığında (20–25°C)

15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkubasyon sırasında 7 adet polipropilen mikrosantrifüj tüpü sırasıyla C7, C6, C5, C4, C3, C2 ve C1 olarak etiketlendi. C7 hariç (yani, C1–C6'ya) tüm tüplere 75 µl LEGENDplex™ tamponu eklendi. 15 dakika sonra, sulandırılan standart hacminin tamamı C7 etiketli mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Bu tüp, top standart olarak kullanıldı. C7 tüpünden C6 tüpüne 25 µL aktarılarak top standartta 1:4 dilüasyon gerçekleştirildi ve karıştırıldı. C5, C4, C3, C2 ve C1 standartlarını elde etmek için bu 1:4 oranındaki seyreltme işlemine devam edildi. LEGENDplex™ tamponu kör standart (C0) olarak kullanıldı.

Testin Yapılışı:

1. Tüm örnek kuyucuklarına 25 µl test tamponu eklendi.
2. Tüm standart kuyucuklarına 25 µl matrix bileşeni eklendi.
3. Uygun standart kuyucuklarına 25 µl C7–C1 standartları eklendi.
4. C0 kuyucuklarına 25 µl tahlil tamponu eklendi.
5. Uygun kuyucuklara 25 µl serum numuneleri eklendi.
6. Boncuklar 30 saniye boyunca vortekslendi, ardından her kuyucuğa 25 µl boncuk eklendi. Boncukların çökmesini önlemek için tüpler aralıklı olarak çalkalandı.
7. Plate'in üzeri kapatılarak, alüminyum folyo ile sarıldı. Folyo ile sarılı plate, plate karıştırıcısına yerleştirildi ve oda sıcaklığında (20–25 °C) 2 saat boyunca 800 rpm'de bekletildi.
8. Daha sonra plate yıkama aşamasına geçildi. Bunun için; plate 1050 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Üzerinde kalan süpernatant uzaklaştırılarak her kuyucuğa 200 µl 1×yıkama tamponu eklendi ve 1 dakika inkübasyona bırakıldı. Santrifüj işlemi tekrar edildi ve süpernatant bir kere daha uzaklaştırıldı.
9. Her kuyucuğa 25 µl tespit antikorları eklendi.

10. Plate'in üzeri yeniden alüminyum folyo ile sarılarak plate karıştırıcısına yerleştirildi ve oda sıcaklığında (20–25°C) 800 rpm'de 1 saat boyunca karıştırıldı.
11. 25 µl SA-PE yıkamadan doğrudan her bir kuyucuğa eklendi ve plate'in üzeri yeniden alüminyum folyo ile sarıldı.
12. Folyo ile sarılı plate, plate karıştırıcısına yerleştirildi. Oda sıcaklığında (20–25°C) 30 dakika boyunca 800 rpm'de karıştırıldı.
13. Daha sonra plate yıkama aşamasına geçildi. Bunun için yine aynı şekilde; plate 1050 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Üzerinde kalan süpernatant uzaklaştırılarak her kuyucuğa 200 µl 1×yıkama tamponu eklendi ve 1 dakika inkübasyona bırakıldı. Santrifüj işlemi tekrar edildi ve süpernatant bir kere daha uzaklaştırıldı.
14. Her bir kuyucuğa 150 µl yıkama tamponu eklendi.
15. Plate 1 dakika boyunca plate karıştırıcısına yerleştirildi ve boncuklar çözelti içinde yeniden süspanse edildi.
16. Örneklerin flow sitometri cihazında okutulması için multi kanallı pipet kullanıldı ve örnekler plate'den FACS tüplerine aktarıldı.
17. Flow sitometri cihazının kurulumu yapıldı. Elde edilen ham veriler FCS Express programı kullanılarak analiz edildi.

2.2.3. Dışkı Numunelerinin Toplanması ve Analizi

Köpek sahiplerine test öncesinde steril gaita toplama kapları verilerek köpeklerinin özellikle sabah ilk yaptıkları dışkı örneğini yere değmeden, steril bir eldiven yardımı ile toplamaları istenmiştir. Hasta sahiplerinin toplamış oldukları dışkı örnekleri hemen alınarak laboratuvara gidene kadar kuru buz içerisinde tutulmuştur. Dışkıda kısa zincirli yağ asidi analizi, kuru madde tayini ve fekal mikrobiyota analizi için örnek toplama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Fekal mikrobiyota analizi için hassas terazi yardımı ile 250 mg dışkı örneği tartılmıştır. Tartılan dışkı numuneleri cryo tüplere aktararak analiz yapılana kadar -80°C'de saklanmıştır.

Dışkı uçucu yağ asidi analizi için toplanan numunelerden homojen şekilde alınan 5 g numune 0,001 g hassasiyetteki hassas terazide tartıldıktan sonra 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Bu numunelere asidifikasyon için 2 N HCl 5 ml eklenerek 3000 rpm hızda, 2-3 dakika boyunca bekletilmiştir. Homojenize edilen numuneler analiz edilene kadar -20°C'de saklanmıştır. Uçucu yağ asidi analizi Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı RUSITEC laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Uçucu Yağ Asidi Analiz Protokolü:

1. HCl ile homojenize edilen dışkı numuneleri bir gece önceden -20°C'den +4°C'ye çıkarılarak çözdürülmüştür.
2. Çözünen numunelere 1 ml %25'lik metafosforik asit ilave edilmiştir.
3. Çözdürülen ve asit ile muamele edilen numuneler 15 dakika soğutmalı santrifüjde (4°C) (Hettich Micro 200R) 15000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatantlar viyallere aktarılmıştır.
4. Elde edilen süpernatantların içerisindeki uçucu yağ asitleri konsantrasyonunu (asetik asit, bütirik asit, propiyonik asit, izobütirik asit, valerik asit, izovalerik asit) belirlemek için GC sistemi (ACME-6100 GC system) kullanılmıştır.
5. Viyallerden alınan 1 µl miktarındaki süpernatantlar GC sistemine enjekte edilmiştir ve HP-Innovax kılcal kolonu (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm film kalınlığı) kullanılarak uçucu yağ asitlerinin konsantrasyonları belirlenmiştir.
6. Asetik asit, bütirik asit, propiyonik asit, izobütirik asit, valerik asit, izovalerik asitin 5, 10, 20 ve 40 mmol/L'lik standartları kullanılarak kalibrasyon yapılmıştır.
7. Enjektör ve dedektör ısıları sırasıyla 250 ve 300°C'ye ayarlanmıştır (Kosuge ve ark., 1961).
8. Dionex Chromeleon yazılımı kullanılarak sonuçlar elde edilmiştir (Demirtaş ve ark., 2019).
9. Dışkı numunelerindeki uçucu yağ asidi miktarları mmol/gram kuru madde cinsinden hesaplanmıştır.

Kuru Madde Analiz Protokolü:

1. Uçucu yağ asidi analizi için süpernantlar alındıktan sonra kalan, içinde metafosforik asit ve dışkı örneği bulunan tüpler etüvde 48 saat boyunca 65°C’de bekletilmiştir.
2. 48 saatin sonunda numuneler etüvden çıkartılmış ve 0,001 g hassasiyetteki hassas terazide tartılmıştır.
3. İçinde kuru dışkı bulunan tüpler tartıldıktan sonra, dışkı örneği kalmayana kadar yıkanmıştır. Yıkama işlemi 2 defa tekrarlanmıştır.
4. Yıkanan ve dışkıdan arındırılan tüpler kuruması için 30 dakika etüvde bekletilmiştir.
5. Kuruyan ve boş olan tüpler hassas tartıda tekrar tartılmıştır.
6. 48 saat sonra etüvden çıkarılıp tartılan tüp ağırlığından, yıkanıp kurutulan ve dışkı örneğinden tam olarak arındırılan tüp ağırlığı çıkartılmıştır.

Fekal Mikrobiyota Analizi:

Çalışma kapsamında fekal mikrobiyota analizi temel olarak; DNA ekstraksiyonu, 16S rRNA genlerinin Illumina ile sekanslanması ve real time PCR olmak üzere 3 aşamadan oluşmaktadır.

DNA İzolasyonu:

Her bir köpekten alınan 250 mg dışkı numunesi DNA izolasyonu yapılabilmek için cryo tüplerde -80°C’de saklanmıştır. DNA izolasyonu için Qiagen, DNeasy PowerSoil Pro Kit kullanılmıştır.

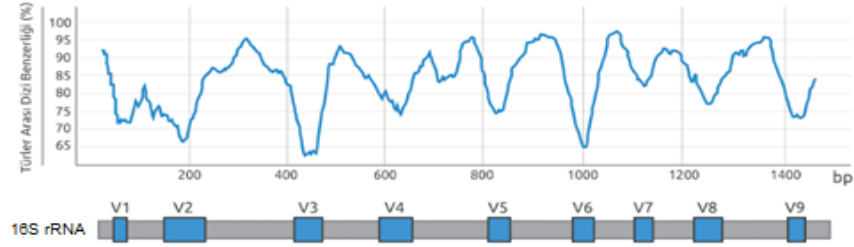
1. Kit içeriğinde bulunan PowerBead Pro tüpüne 250 mg dışkı numunesi ve 800 µl CD1 solüsyonu eklendi ve karışması için vortekste bekletildi.
2. PowerBead Pro tüp 1,5–2 ml’lik vortex adaptörüne horizontal olarak sabitlendi ve 10 dakika boyunca maksimum hızda vortekste bekletildi.
3. PowerBead Pro tüpü 1 dakika boyunca 15000 rpm’de santrifüj edildi.

4. Elde edilen süpernatant, kit içeriğinden çıkan 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
5. 200 µl CD2 solüsyonu eklenerek, 5 saniye vortekte bekletildi ve 1 dakika boyunca 15000 rpm'de santrifüj edildi.
6. Elde edilen 700 µL süpernatant, kit içeriğinden çıkan 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
7. 600 µl CD3 solüsyonu ilave edildi ve 5 saniye boyunca vortekte bekletildi.
8. MB spin kolonuna 650 µl lizat eklendi ve 1 dakika 15000 rpm'de santrifüj edildi.
9. MB spin kolonu kit içeriğinde bulunan 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi.
10. MB spin kolonuna 500 µl EA solüsyonu eklendi ve 1 dakika 15000 rpm'de santrifüj edildi.
11. MB spin kolonu tekrar aynı 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi.
12. MB spin kolonuna 500 µl C5 solüsyonu ilave edildi ve 1 dakika 15000 rpm'de santrifüj edildi.
13. MB spin kolonu yeni 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve 2 dakika boyunca 16000 rpm'de santrifüj edildi.
14. MB spin kolonu kit içeriğinde bulunan 1,5 ml'lik elüsyon tüpüne yerleştirildi.
15. Beyaz filtre membranının merkezine 50 µl C6 solüsyonu ilave edildi ve 1 dakika boyunca 15000 rpm'de santrifüj edildi.

16S rRNA Sekanslama ve Biyoinformatik Analizi:

16S rRNA tabanlı metagenomik analizlerde, 16S rRNA geninin bir bölgesi hedefli olarak PCR ile zenginleştirilip, elde edilen tüm PCR ürünleri dizilenmektedir. Ribozomal RNA'ların kodlanmasını sağlayan yaklaşık 1500 baz uzunluğundaki bu gen, büyük oranda tüm bakteri ve arkea türlerinde bulunmaktadır. Gen içerisinde son derece korunmuş bölgeler yer almakla beraber, aynı zamanda farklı bakteri türlerinin filogenetik olarak sınıflandırılmasına olanak verecek kadar değişkenlik gösteren

bölgeler de içermektedir. Genetik dizi olarak değişkenlik gösteren bu bölgeler “variable” (V1, V2, V3 vb.) olarak isimlendirilir (Şekil 2.8). Farklı türler arasındaki 16S rRNA variable bölgelerindeki dizi farklılıkları, evrimsel uzaklık ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Bu sebeple 16S rRNA dizisi, farklı bakteri türlerinin belirlenmesinde bir belirteç olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.8. 16S rRNA Gen Bölgesi ve Değişken (Variable) Bölgeleri.

Şu ana kadar yapılmış çok sayıda çalışma ile kültür ve çevresel örneklerden elde edilmiş sayısız bakteriyel türün 16S rRNA dizileri çıkarılmıştır. Bu diziler, GreenGenes , Ribosomal Database Project ve SILVA dahil olmak üzere çeşitli veri tabanlarında kayıt altına alınmıştır. Yeni nesil dizileme gibi yöntemlerle elde edilen yüksek hacimli dizi verileri, bu veritabanları ile kıyaslanarak tespit edilen DNA parçalarının hangi türe ait olduğu oransal olarak hesaplanabilmektedir.

Kütüphane Hazırlığı

İzolasyon sonrasında her bir DNA örneğindeki 16S rRNA V3-V4 bölgelerinin zenginleştirilmesi için 16S Forward ve 16S Reverse kodlu 16S Universal Eubakteriyal primerler kullanılmıştır. Klindworth ve ark. (2012)’ın gerçekleştirdiği kapsamlı çalışmada kullanılan bu primerler, en yüksek etkinlik sunan primer seti olarak seçilmiştir. Projede, kütüphane hazırlığı sırasında 2 basamaklı PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemlerde, PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara, Japan, #R050B) enzimi kullanılarak her bir örnek için ayrı ayrı 25 döngülü PCR gerçekleştirilmiştir. Birinci PCR aşamasında, 95°C’de 3 dakika ardından 25 döngü

boyunca 95°C-30 saniye + 55°C-30 saniye + 72°C-30 saniye ve son olarak tek döngü 72°C’de 5 dakika koşulları uygulanmıştır. Kullanılan primerler;

- 16S Forward (CCTACGGGNGGCWGCAG)
- 16S Reverse (GACTACHVGGGTATCTAATCC)

İkinci PCR uygulamasında, Illumina index ve adaptör dizilerinin eklenmesi için Nextera XT Index Primer 1 ve Nextera XT Index Primer 2 setleri (illumina, USA, #FC-131-2001) kullanılmıştır. Bu PCR aşamasında, 95°C’de 3 dakika ardından 8 döngü boyunca 95°C-30 saniye + 55°C-30 saniye + 72°C-30 saniye; ve son olarak tek döngü 72°C’de 5 dakika koşulları uygulandı. Her iki PCR işlemi sonrasında Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, USA, #A63881) kiti ile saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

PCR sonrasında, hazırlanan kütüphanenin Qubit florometresi ile ölçümü yapılmıştır ve normalizasyon sonrası dizileme işlemine alınmıştır.

1. 16S rRNA sekanslama işlemine başlamadan önce DNA izolasyonu yapılan numunelerde DNA miktarını belirlemek için Qubit ölçümü yapıldı.
2. Bakteriyel DNA amplifikasyonu için, 16S rRNA geninin V3-V4 bölgelerini hedefleyen 341F ve 805R primerleri ile ekstre edilen metagenomik DNA örnekleri kullanıldı.
3. Illumina Nextera barkodları için ikincil bir amplifikasyon gerçekleştirildi.
4. PCR ürünlerine %2 agaroz jel üzerinde elektroforez uygulandı.
5. Biyoinformatik analiz için Illumina NovaSeq 6000 platformu kullanılmıştır ve 1 Milyon x 2 (150 bp x 2) okuma ile dizileme işlemi gerçekleştirildi.

Dizileme uygulaması, Refgen tarafından (Refgen Biyoteknoloji, Turkey), NovaSeq 6000 (Illumina, USA) yeni nesil dizileme platformu ve NovaSeq 6000 S4 Reagent kiti (Illumina, USA) ile çift yönlü (2x150 bp) okuma ile ve üretici firma yönergeleri takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

Biyoinformatik Analiz

Dizileme işlemi sonrasında, elde edilen okuma verilerinin kalite kontrolü amacıyla FASTQC aracı kullanılmıştır. Kalite kontrol sonuçlarına göre her bir örneğin, veri miktarları, okuma kaliteleri, GC dağılımları, kmer dağılımları ve olası adaptör kontaminasyonları incelenmiştir. Dizileme sürecinde, ham okuma verilerindeki düşük kalitedeki baz okumaları ve olası adaptör-indeks kontaminasyonlarının sonraki analiz basamaklarında sapmalara neden olmaması için, okumalardan kırılmıştır. Kalite değerlerine göre kırma işlemleri için Trimmomatic (v0.39) aracı kullanılmıştır (Bolger ve ark., 2014). Bu basamakta, okuma uçlarındaki düşük kaliteli baz okumaları, olası adaptör kontaminantları ile kimerik diziler, Genomes OnLine Database (GOLD) temel alınarak ve Trimmomatic aracı ile kırılmıştır. Taksonomik profillendirme için okumalar, Kraken2 aracı kullanılarak RefSeq (Standard-Full) (Şubat 2022) veritabanı temel alınarak hedef organizmalara hizalanmıştır (Wood ve ark., 2019; Quast ve ark., 2013). Hizalama sonrasında her bir örnekteki operasyonel taksonomik ünite (OTU) grupları belirlenmiştir. Çeşitlilik endekslerinin hesaplanmasında R::vegan paketi kullanılmıştır (Oksanen ve ark., 2019). Verilerin raporlanması, istatistik analizleri ve veri görselleştirme çalışmalarında R betikleri kullanılmıştır.

2.2.4. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada istatistiksel analizler SPSS 22.0 paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Verinin normal dağılıma uygunluğunu değerlendirmek için bir normalite testi olan Shapiro-Wilk testi uygulandı. Normal dağılıma uygun bulunan verilerin grup karşılaştırmalarında bireysel örneklem t-testi kullanıldı. Normal dağılım kriterlerini karşılamayan verilerin grup karşılaştırmalarında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Köpeklerin pati tercihlerinin karşılaştırılmasında Ki-kare testi kullanıldı. Köpeklerin mikrobiyota profilleri ile nesne seçim testindeki performansları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesinde MANOVA (Multivariate Analysis of Variance) testi kullanıldı. MANOVA analizinde mikrobiyota profilleri bağımlı değişken, test

performansları ise sabit faktör (fixed factor) olarak tanımlandı. Testlerin tamamında $p \leq 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Verilere ilişkin tanımlayıcı istatistikler "Aritmetik Ortalama $\pm$ Standart Hata" şeklinde gösterilmiştir.



3. BULGULAR

3.1. Demografik Bilgiler

Araştırmaya katılan toplam 20 köpekten 2'si sağlık durumlarından dolayı yeterli numune temin edilemediğinden araştırmadan çıkartılmıştır. Köpeklerin yaşlarının ortalaması 10,68 (8-14 yaş) olarak tespit edilmiştir. Toplamda 12 dişi ve 6 erkek köpek çalışmaya dahil olmuştur. Araştırma dahilinde toplamda 18 köpeğin dışkı analizleri dışındaki tüm analizleri gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.1). Dışkı analizlerinde 20 köpekten 3'ü yeterli numune temin edilemediği için araştırmadan çıkartılmıştır. Sonuç olarak dışkı analizleri için 17 köpek çalışmaya dahil edilmiştir.

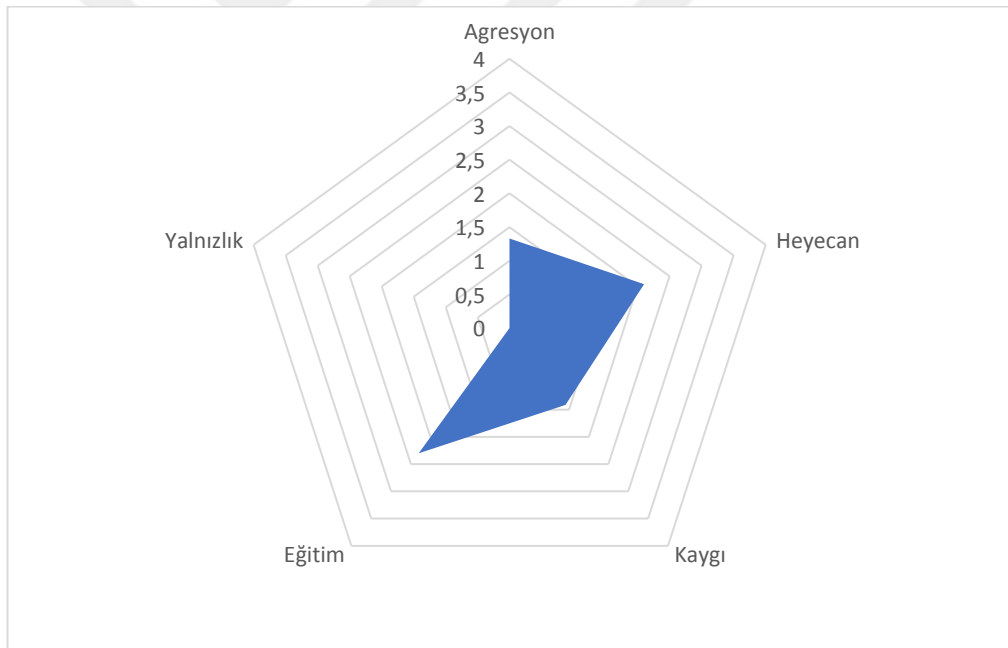
Çizelge 3.1. Köpeklerin demografik bilgileri.

Grup	İrk	Cinsiyet	Yaş	İsim
1	Labrador Retriever	Dişi	9	Bel.
1	Labrador Retriever	Erkek	9	Smi.
1	Alman Çoban Köpeği	Erkek	14	Ali.
1	Golden Retriever	Dişi	10	Mi.
1	Terrier	Erkek	8	Ale.
1	Melez	Dişi	12	Dor.
1	Beagle	Dişi	13	Par.
1	Rottweiler	Erkek	10	Hay.
2	Melez	Dişi	13	Ner.
2	Golden Retriever	Erkek	14	Tar.
2	Melez	Erkek	8	Bar.
2	Melez	Dişi	9	Bad.
2	Golden Retriever	Dişi	8	Bl.
2	Pitbull	Erkek	9	Lat.
2	Terrier	Erkek	12	Boz.
2	Terrier	Dişi	10	Opr.
2	Cocker Spaniel	Dişi	13	Sho.
2	Golden Retriever	Dişi	8	Fın.

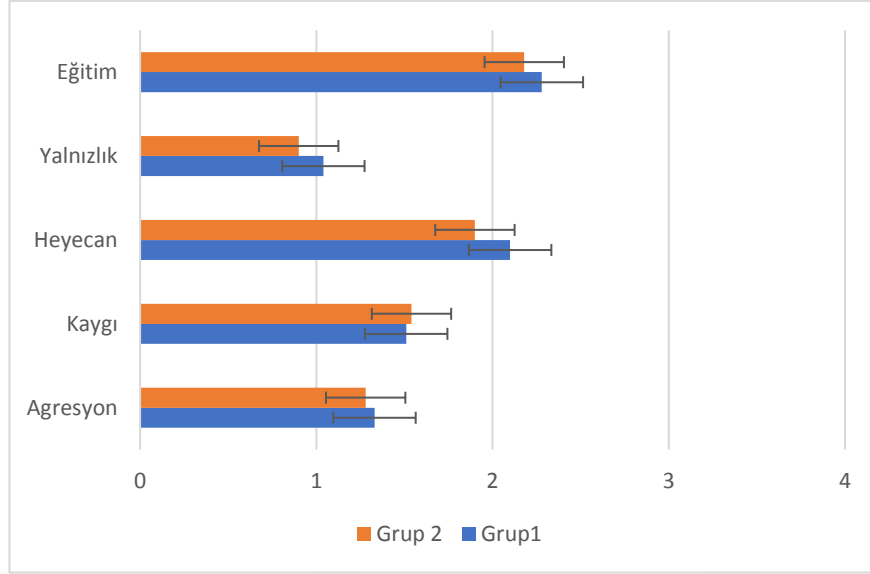
3.2. Davranış Değerlendirmeleri

3.2.1. CBARQ Analizleri

CBARQ analizleri agresyon, kaygı, heyecan, eğitim, yalnızlık ve diğer olmak üzere 6 ana başlık altında gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Buna göre ortalama agresyon skoru 1,33/4,00 (min: 0, mak: 4), ortalama heyecan skoru 2,11/4,00, (min: 0, mak: 4), ortalama kaygı skoru 1,53/4,00 (min: 0, mak: 4), ortalama yalnızlık skoru 0,96/4,00 (min: 0 , mak: 1), ortalama eğitim skoru ise 2, 22/4,00 (min: 0, mak: 4) olarak belirlenmiştir (Şekil 3.1). Gruplar arasında alt kategoriler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Mann-Whitney U, $p \geq 0,05$). CBARQ skorlarının grup ortalamaları grafik halinde sunulmuştur (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. Köpeklerin CBARQ Skor Dağılımları.

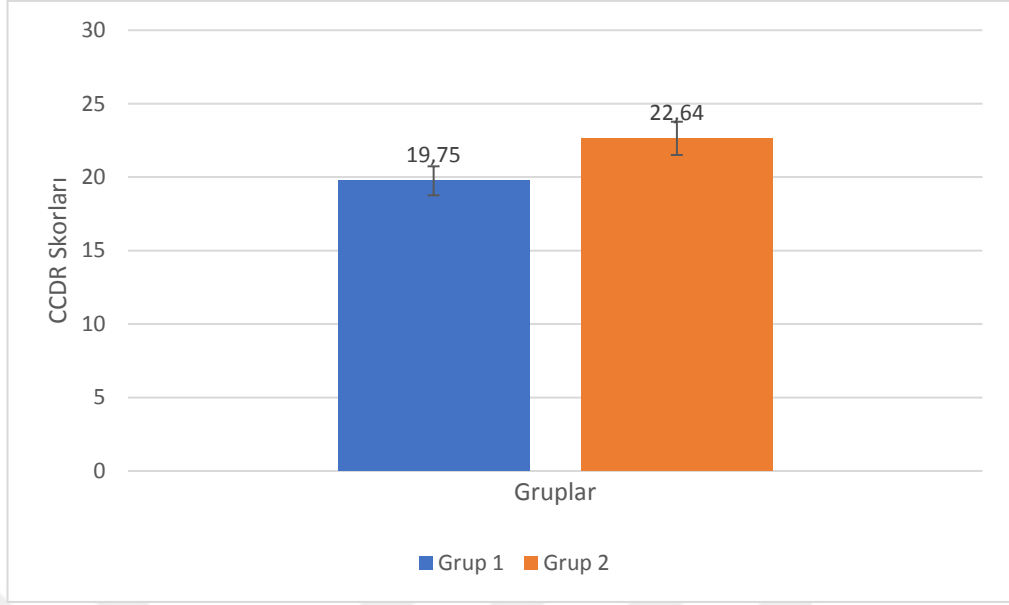


Şekil 3.2. CBARQ skorları açısından gruplar arasındaki farklar.

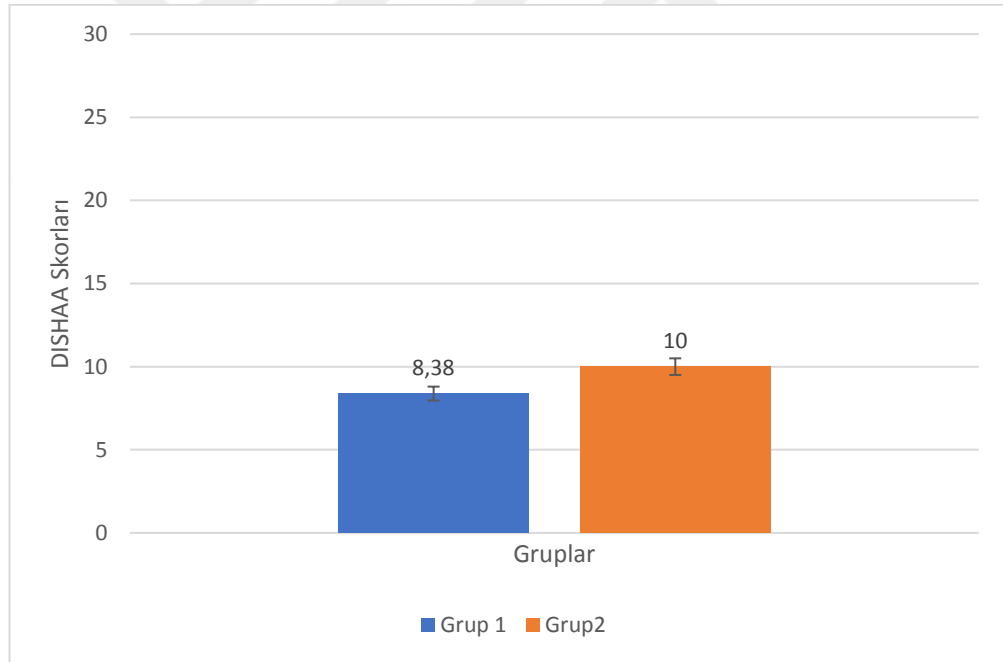
3.2.2. Bilişsel Fonksiyon Bozukluğuna İlişkin Analizler

Bilişsel fonksiyon bozukluğuna ilişkin anket ve davranışsal değerlendirmelerde köpeklerin hiçbirisinde bilişsel fonksiyon bozukluğuna ilişkin klinik semptom tespit edilmemiştir. CCDDR sonuçlarının değerlendirilmesinde Salvin ve ark. (2011)'a uygun olarak 50'den yüksek puanların yaşlı köpeklerde bilişsel fonksiyon bozukluğu gösterici nitelikte olduğu göz önünde bulundurulmuştur. Köpeklerin hiç birisinde 50 ve üzerinde puan tespit edilmemiş olup genel ortalama 21, 42 (min: 9; mak: 36) olarak belirlenmiştir (Şekil 3.3). CCDDR skorları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Mann-Whitney U, $p \geq 0,05$).

DISHAA değerlendirmesinde göre $16 \leq$ skorlar orta dereceli, $30 \leq$ skorlar şiddetli seviyede bilişsel gerilemeyi göstermektedir. Bu değerlendirmeye göre köpeklerin sadece bir tanesinde orta dereceli bilişsel gerileme tespit edilmiş olup genel ortalama 9,05 (Min: 2, Mak: 24) olarak belirlenmiştir (Şekil 3.4). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Mann-Whitney U, $p \geq 0,05$).



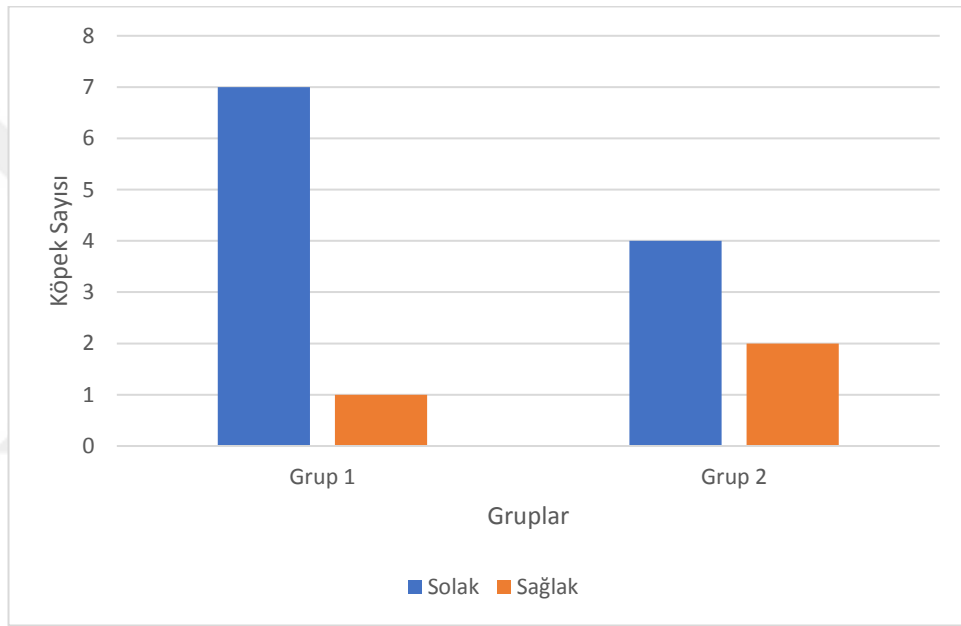
Şekil 3.3. Gruplara göre CCDR skor ortalamaları.



Şekil 3.4. Gruplara göre DISHAA skor ortalamaları.

3.2.3. Pati Tercihinin Belirlenmesi

Yıllık aşılama yapılan köpekler ile en az üç yıl önce aşılanmış köpekler arasında lateralizasyon yönü açısından anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Ki-kare testi, $p=0,538$; Şekil 3.5). KONG testi uygulanan 15 köpeğin 11'inin ilk pati tercihi sol iken 3'ünün ilk olarak sağ patilerini kullandıkları belirlenmiştir. Köpeklerden 1 tanesi ise KONG'a ilgi göstermekle birlikte herhangi bir pati tercihinde bulunmamıştır.

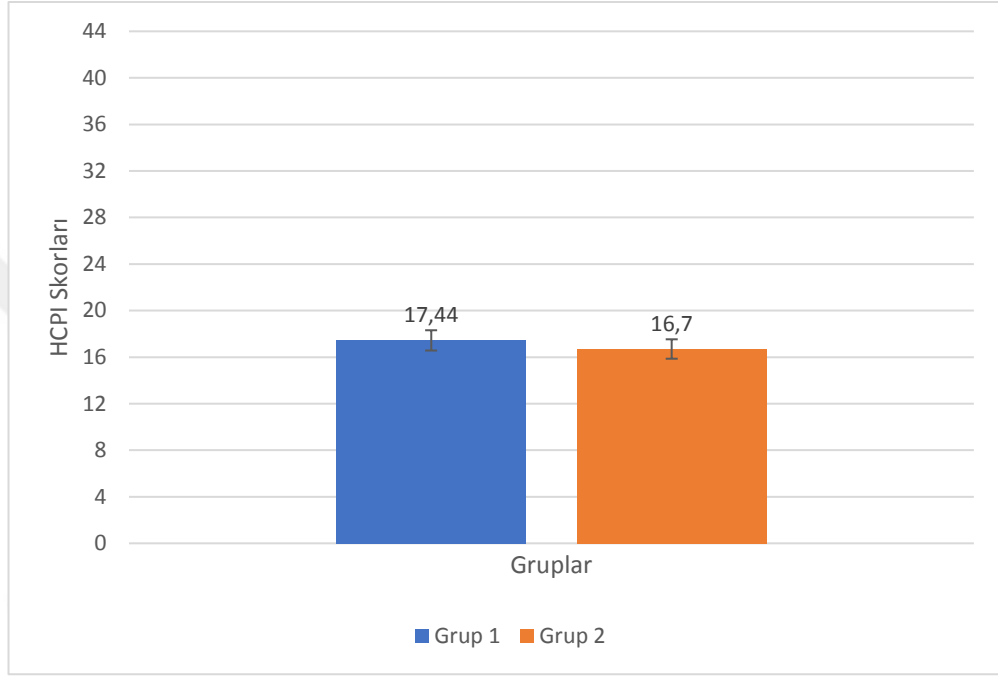


Şekil 3.5. Köpeklerin gruplara göre pati tercihleri.

3.2.4. Ağrı Değerlendirmesi

Köpeklerin ağrı değerlendirmesinde Helsinki Kronik Ağrı İndeksi kullanılmıştır. Bu ölçeğe göre her bir cevap 0 ile 4 arasında bir değerle ifade edilmiştir. Ölçek skorları toplandığında, toplam minimum indeks puanı 0 ve maksimum puanı 44 şeklinde değerlendirilmiştir (Mölsa ve ark., 2013). Her soruda 0 ve 1 değeri normal ruh hali, davranış ve hareketlilik anlamına gelirken, 2, 3 ve 4 puan artan şiddette ağrıyı göstermektedir. Ölçeğin değerlendirilmesinde 0 ile 6 arasında bir indekse sahip köpekler sağlıklı köpekler, bu değer üzerinde bulunan köpeklerin ise kronik

ağrılı olduğu kriteri göz önünde bulundurulmuştur. Her iki gruptaki köpeklerin yalnızca birinin ağrı skoru 5 olarak değerlendirilmiş olup kalan köpeklerin tamamında kronik ağrı durumu tespit edilmiştir. Köpeklerin ortalama ağrı indeksi 17,05 (Min: 5; Mak: 32) olarak belirlenmiştir (Şekil 3.6). Gruplar arasında ağrı skorları açısından anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Mann-Whitney U, $p \geq 0,05$).



Şekil 3.6. Köpeklerin ortalama kronik ağrı indeksleri.

3.2.5. QoL Değerlendirmesi

Köpeklerin kaliteli yaşam ile ilişkili değerlendirmeleri sahipleri tarafından gerçekleştirilmiştir. Bölümlere göre skor ortalamaları aşağıda sunulmaktadır.

i. Mutluluk ile İlişkili Skorlar:

Köpeklerin bu bölümden aldıkları ortalama skor 2,82/4,00 olarak belirlenmiştir.

ii. Mental Durum ile İlişkili Skorlar:

Köpeklerin bu bölümden aldıkları ortalama skor 1,53/4,00 olarak belirlenmiştir.

iii. Ağrı ile İlişkili Skorlar:

Köpeklerin bu bölümden aldıkları ortalama skor 0,63/4,00 olarak belirlenmiştir.

iv. İştah ile İlişkili Skorlar:

Köpeklerin bu bölümden aldıkları ortalama skor 2,36/4,00 olarak belirlenmiştir.

v. Hijyen ile İlişkili Skorlar:

Köpeklerin bu bölümden aldıkları ortalama skor 1,67/4,00 olarak belirlenmiştir.

vi. Sıvı Dengesi ile İlişkili Skorlar:

Köpeklerin bu bölümden aldıkları ortalama skor 2,54/4,00 olarak belirlenmiştir.

vii. Hareketlilik ile İlişkili Skorlar:

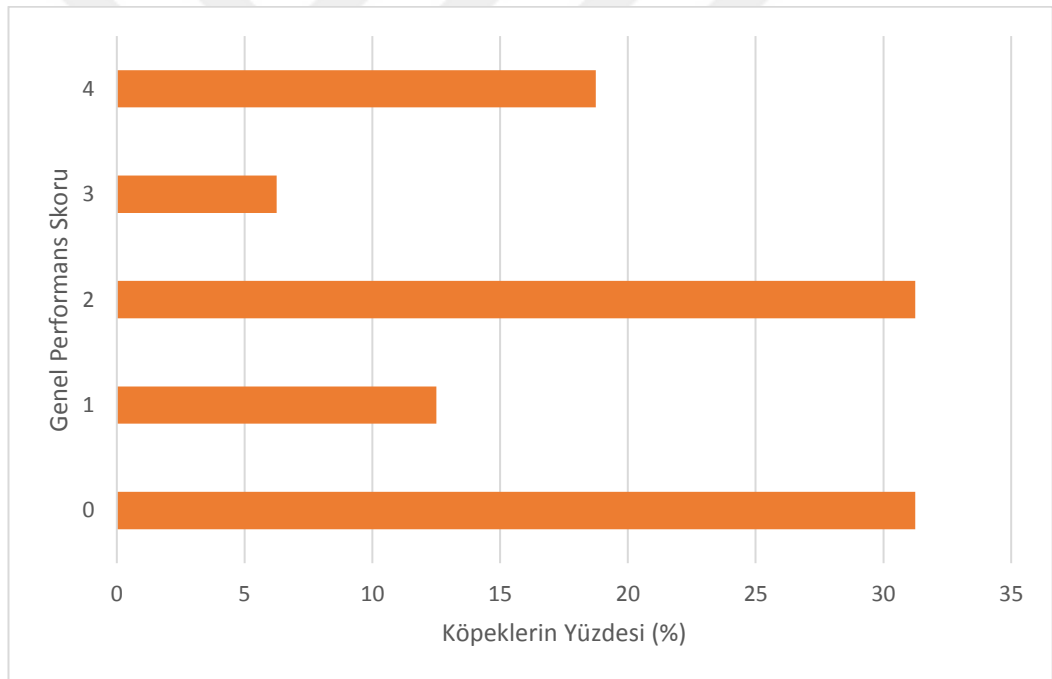
Köpeklerin bu bölümden aldıkları ortalama skor 2,42/4,00 olarak belirlenmiştir.

3.2.6. Video Analizi

Nesne Seçim testi:

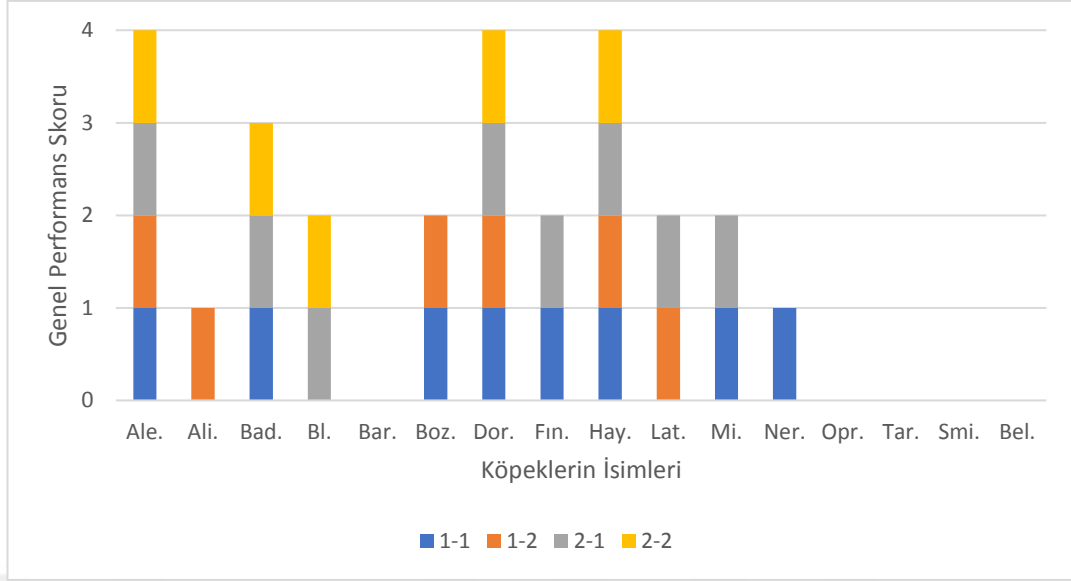
Bellek testinin değerlendirilmesinde performans ve ağırlık ile ilişkili iki temel kategori göz önünde bulundurulmuştur. Performans süresi ve başarısı açısından gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

Bellek performans testine katılan 16 köpeğin %31,25'inin genel performans skoru 0, %12,5'inin 1, %31,25'inin 2, %6,25'inin 3, %18,75'inin 4 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.7).



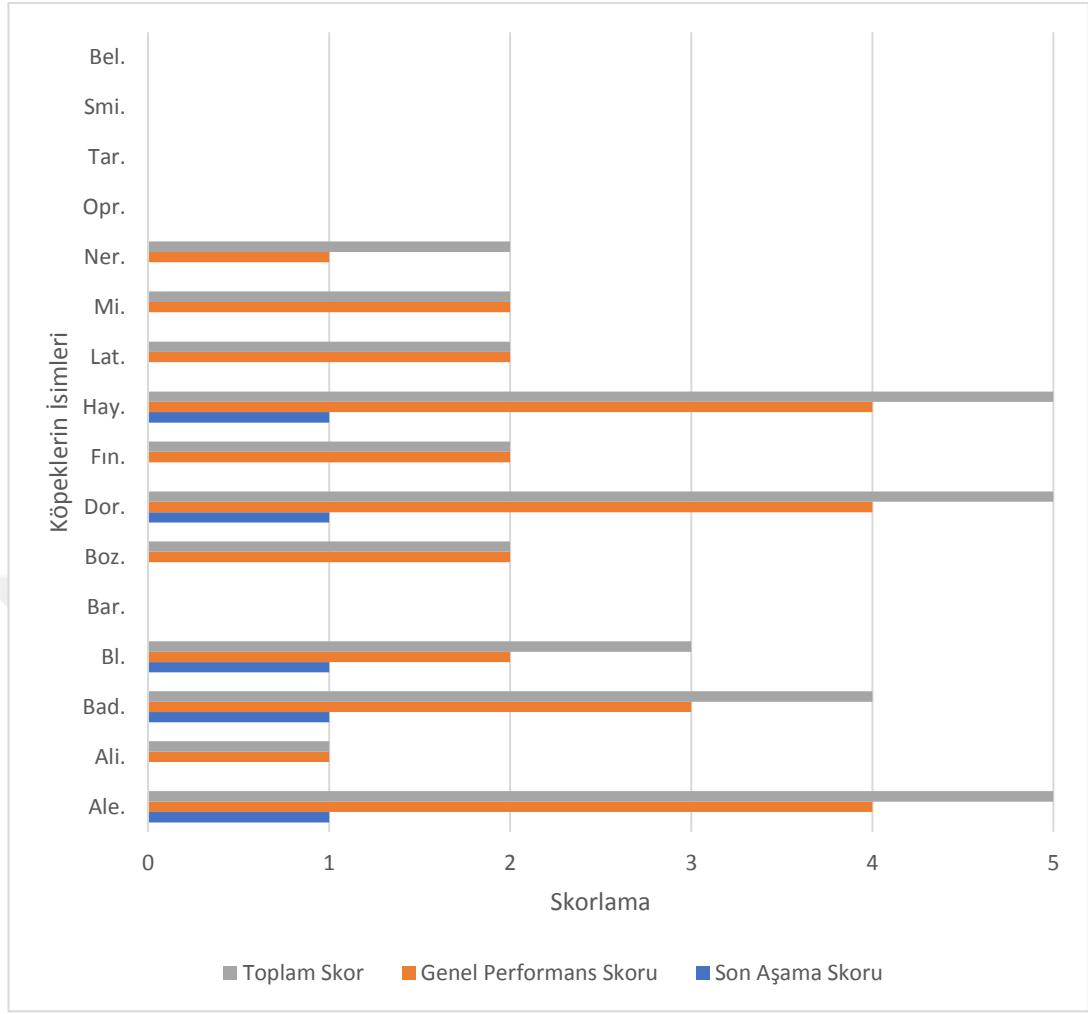
Şekil 3.7. Çalışmaya katılan köpeklerin genel performans skorları (%).

Nesne seçim testi değerlendirilirken 4 aşamaya ayrılmıştır. Bu 4 aşama sırasında köpeklerin bireysel olarak gösterdikleri performans ayrı ayrı Şekil 3.8'de belirtilmiştir. Genel performans skorlaması köpeklerin 4 test aşamasında da aktif olup olmadıklarına göre yapılmıştır.



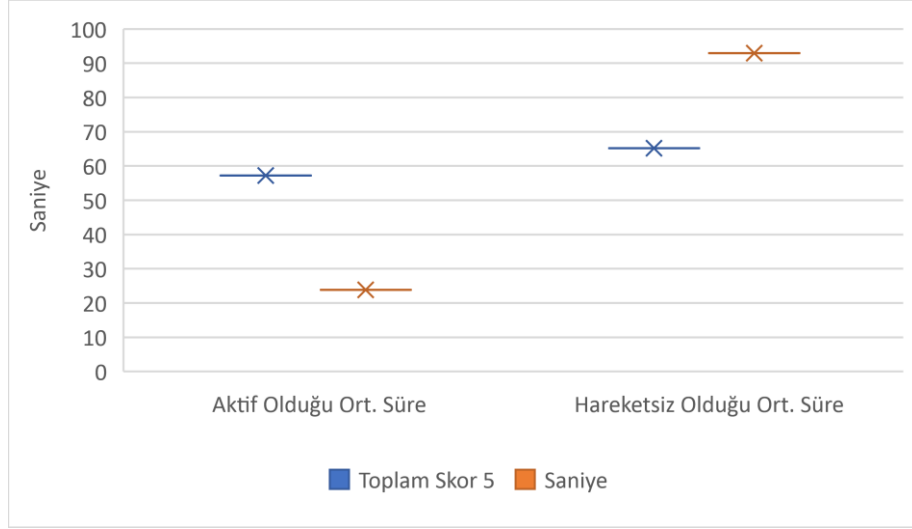
Şekil 3.8. Nesne seçim testi aşamalarında köpeklerin genel performans skoru.

Toplam skor hesaplanırken köpeklerin en son aşamaya (2-2) kadar gelmeleri dikkate alınmıştır. Son aşamaya gelen köpeklerin genel performans skoruna 1 puan eklenmiştir ve bu skor son aşama skoru olarak isimlendirilmiştir. Genel performans skoru ile son aşama skorunun toplamı ile toplam skor hesaplanmıştır. Çalışmaya katılan köpeklerin genel performans skoru, son aşama skoru ve toplam skoru Şekil 3.9’da gösterilmiştir.



Şekil 3.9. Çalışmaya katılan köpeklerin genel performans, son aşama ve toplam skorları.

Köpeklerin toplam skoru ve testin ilk aşamasının toplam süresi arasındaki ilişki Şekil 3.10’da belirtilmiştir. Toplam zaman ve toplam skor arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.



Şekil 3.11. Toplam skoru 5 ve 0 olan köpeklerin aktivitelerinin karşılaştırılması.

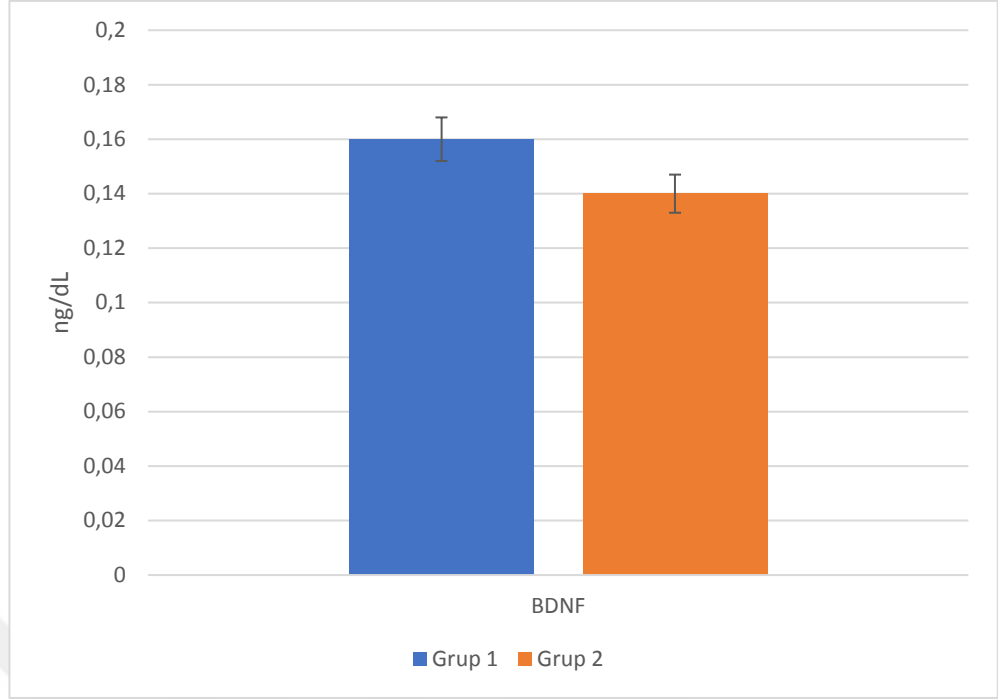
3.3. Fizyolojik Parametreler

3.3.1. Hemogram ve FT4 Analizi

Hemogram ve FT4 analizleri sonucunda köpeklerin tamamının değerlerinin normal referans aralığında olduğu tespit edilmiştir.

3.3.2. BDNF Analizi

Köpeklerin BDNF ortalamaları 0,154 ng/dL (SD: 0,082) olarak belirlenmiştir. Grup 1'in BDNF ortalamaları 0,16 ng/dL (SD: 0,087) olarak tespit edilirken Grup 2'nin BDNF ortalamaları 0,14 ng/dL (SD: 0,087)'dir (Şekil 3.12). Gerçekleştirilmiş olan BDNF analizleri sonrasında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (T-test; $p \geq 0,05$).



Şekil 3.12. Grupların BDNF değerleri (ng/dL).

3.4. Dışkı ile İlgili Analizler

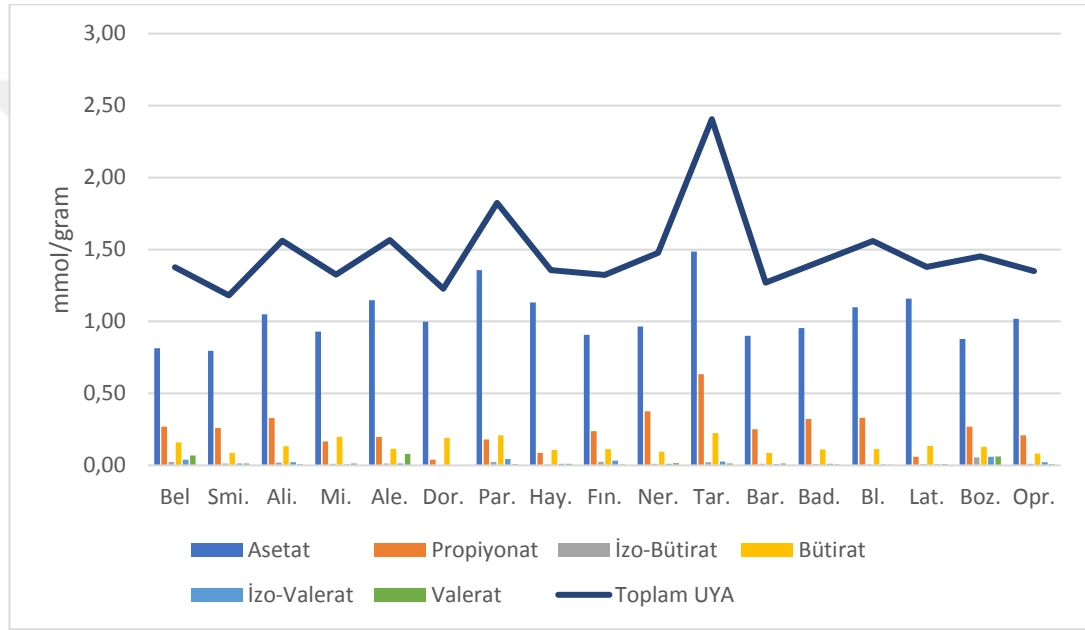
i. Uçucu Yağ Asidi (UYA) Analizleri

Çalışma kapsamında analizi gerçekleştirilen toplam UYA değerlerine ait veriler Çizelge 3.2’de gösterilmiştir. Grup 1 ve Grup 2’yi oluşturan köpeklerin UYA miktarlarının karşılaştırılması Şekil 3.13’te gösterilmiştir.

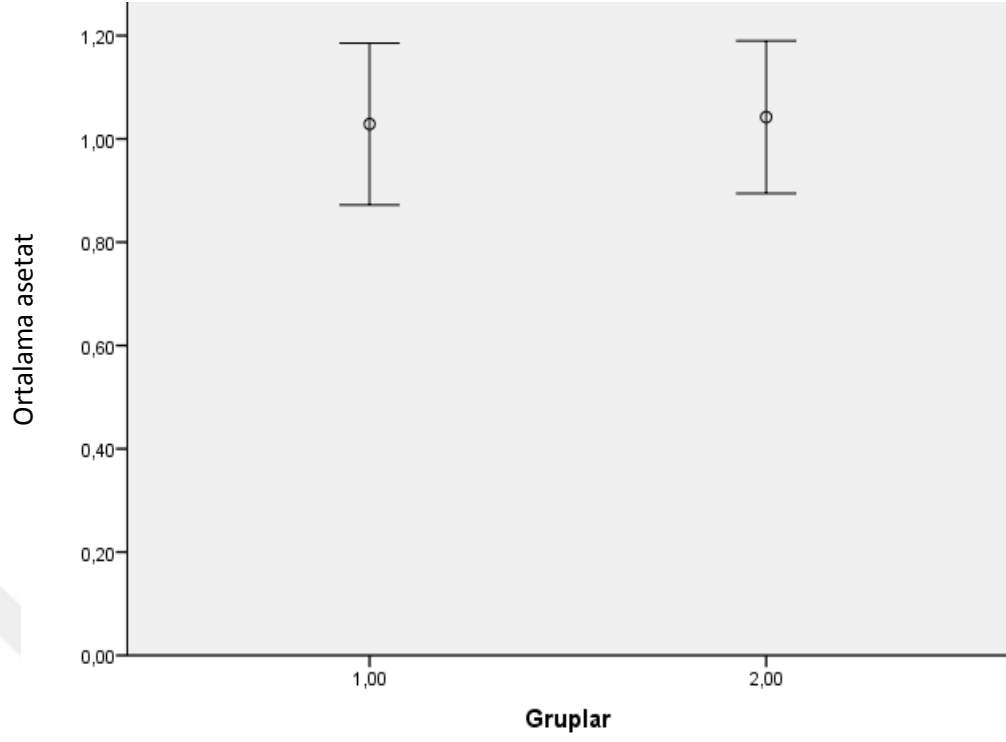
Gruplar arasındaki UYA miktarlarının karşılaştırılması Şekil 3.14, Şekil 3.15, Şekil 3.16, Şekil 3.17, Şekil 3.18, Şekil 3.19 ve Şekil 3.20’te belirtilmiştir. Grup 1 ve 2 arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiş ($p \geq 0,05$) olup dışkıdaki asetat/propiyonat/bütirat oranları Şekil 3.21’te gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Gram Kuru Madde İçindeki UYA Miktarları.

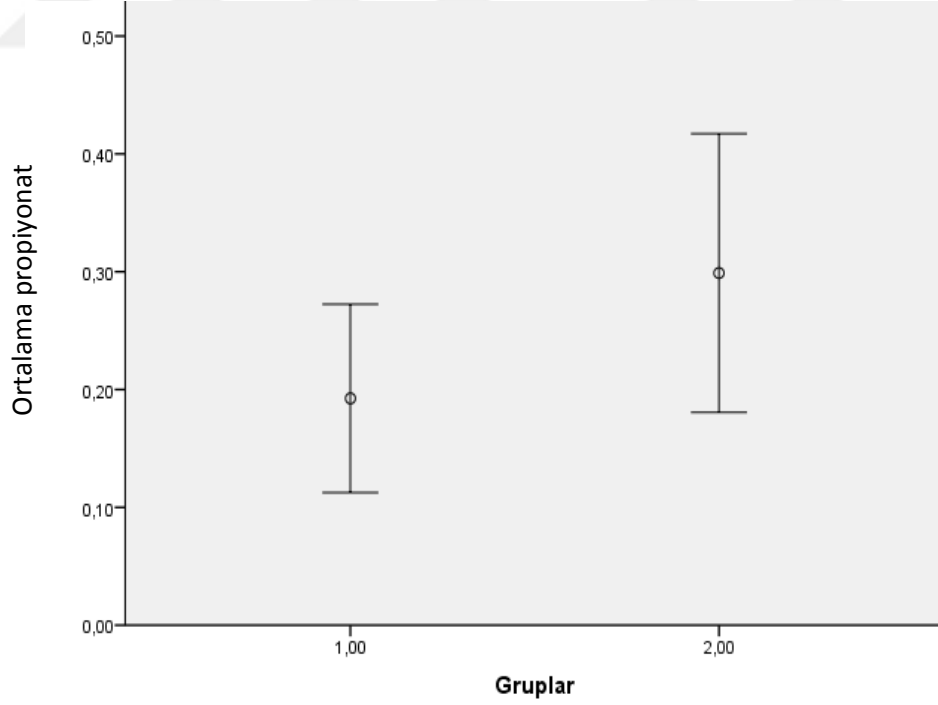
	Asetat mmol/gr	Propiyonat mmol/gr	Bütirat mmol/gr	İzobütirat mmol/gr	Valerat mmol/gr	İzovalerat mmol/gr	Toplam UYA mmol/gr
Ortalama	1,0359	,2488	,1353	,0147	,0200	,0194	1,4747
N	17	17	17	17	17	17	17
Std. Sapma	,18416	,13720	,04460	,01068	,02449	,01560	,28520



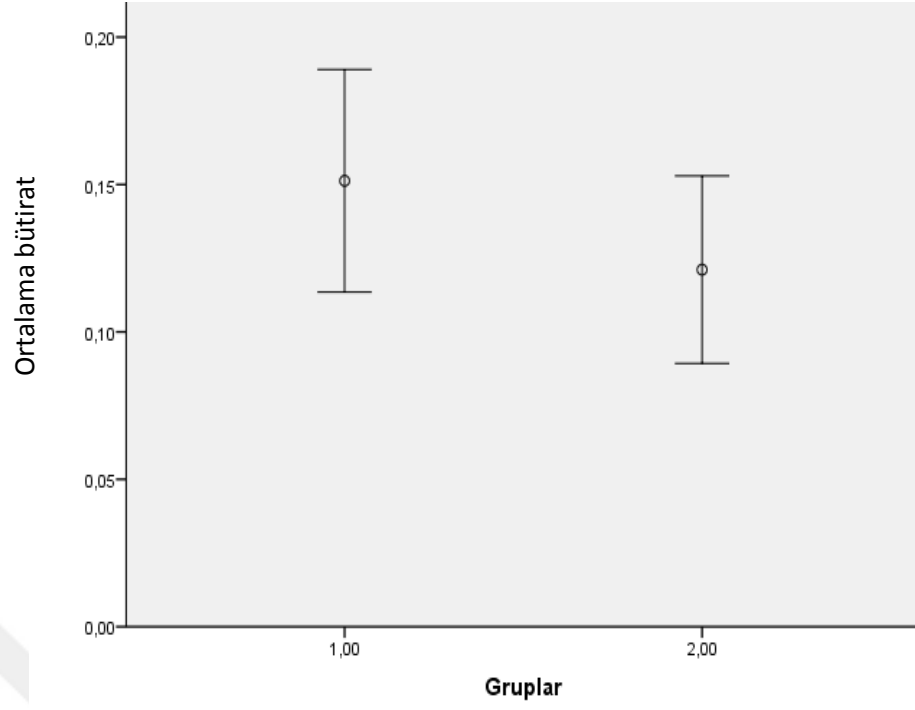
Şekil 3.13. Çalışmaya katılan tüm köpeklerin UYA miktarlarının karşılaştırılması.



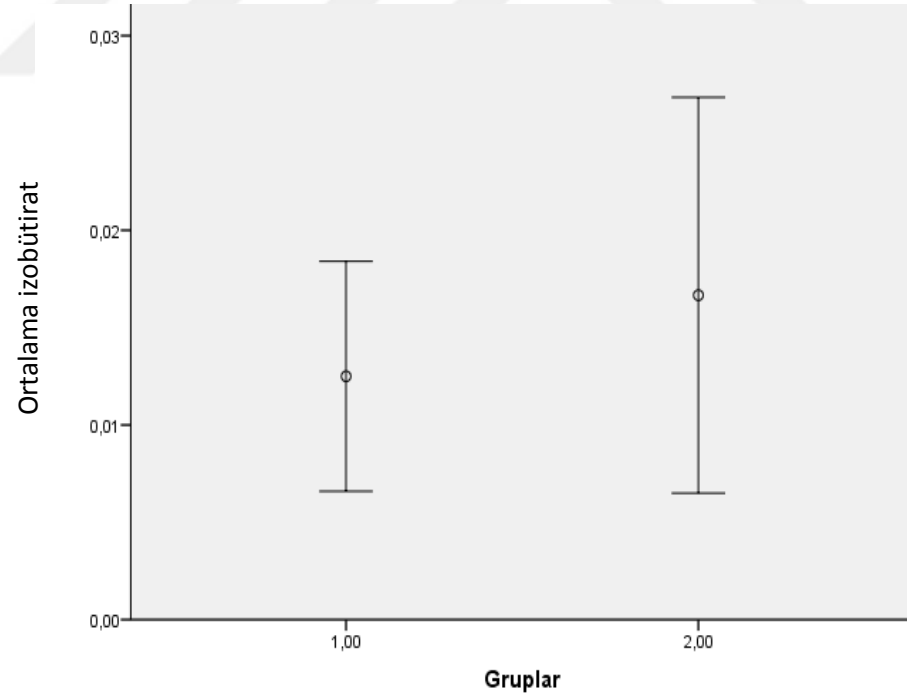
Şekil 3.14. Gruplara göre asetat miktarı.



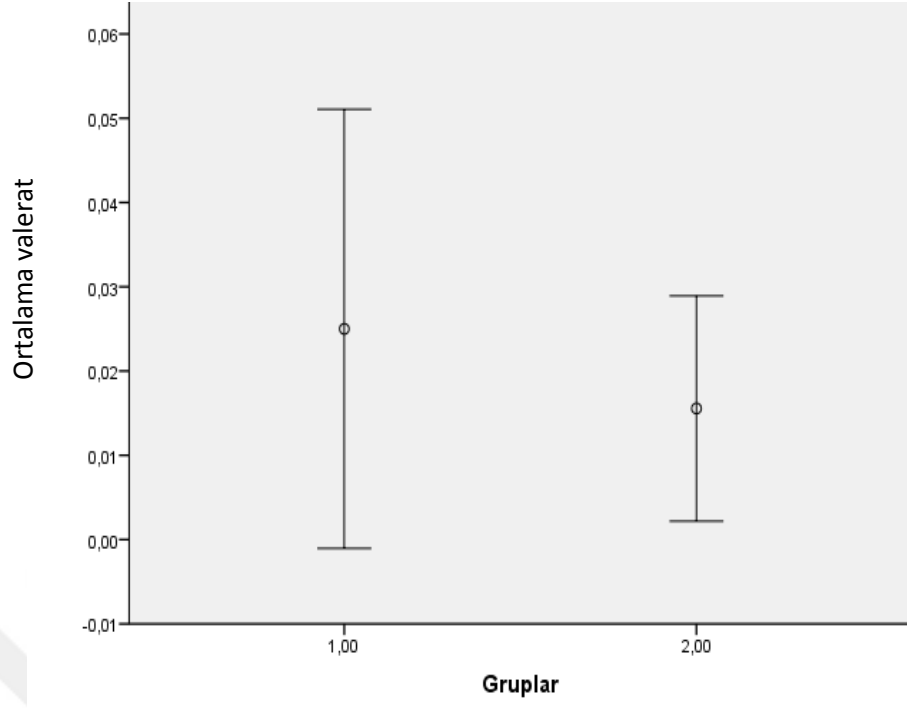
Şekil 3.15. Gruplara göre propiyonat miktarı.



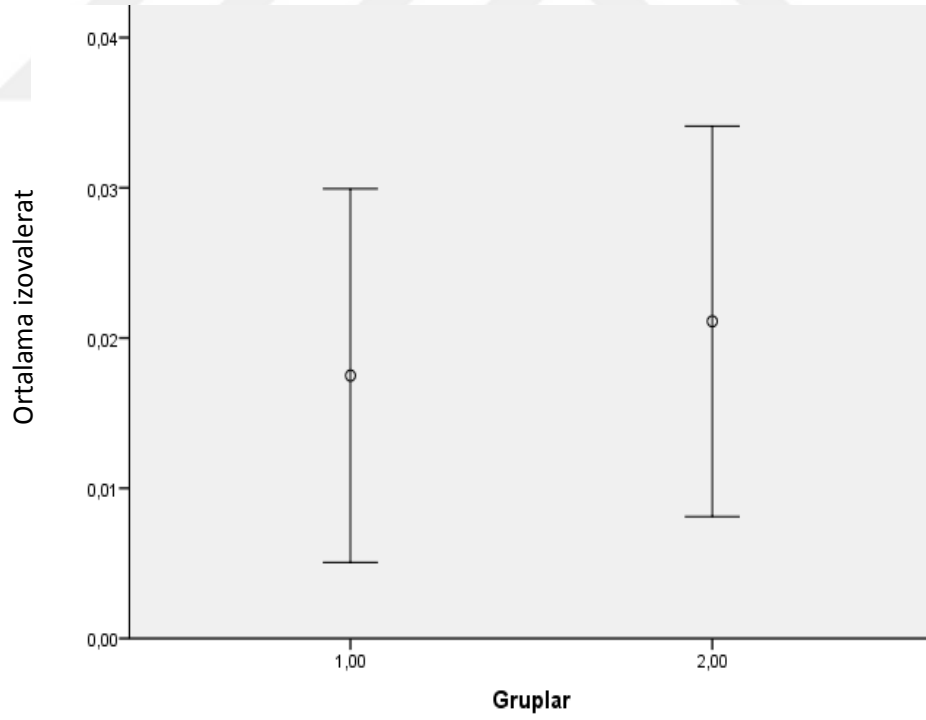
Şekil 3.16. Gruplara göre bütirat miktarı.



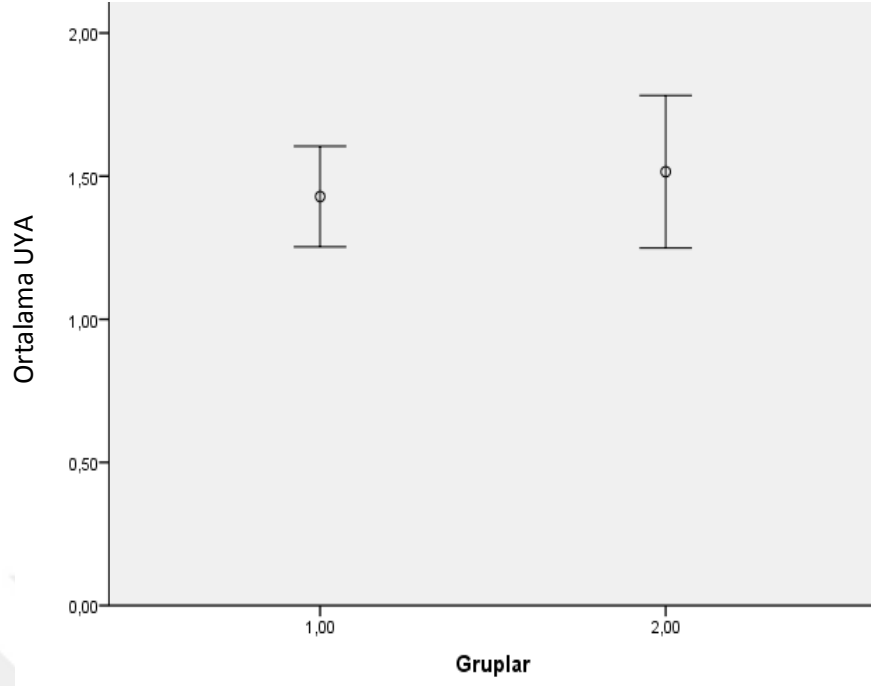
Şekil 3.17. Gruplara göre izobütirat miktarı.



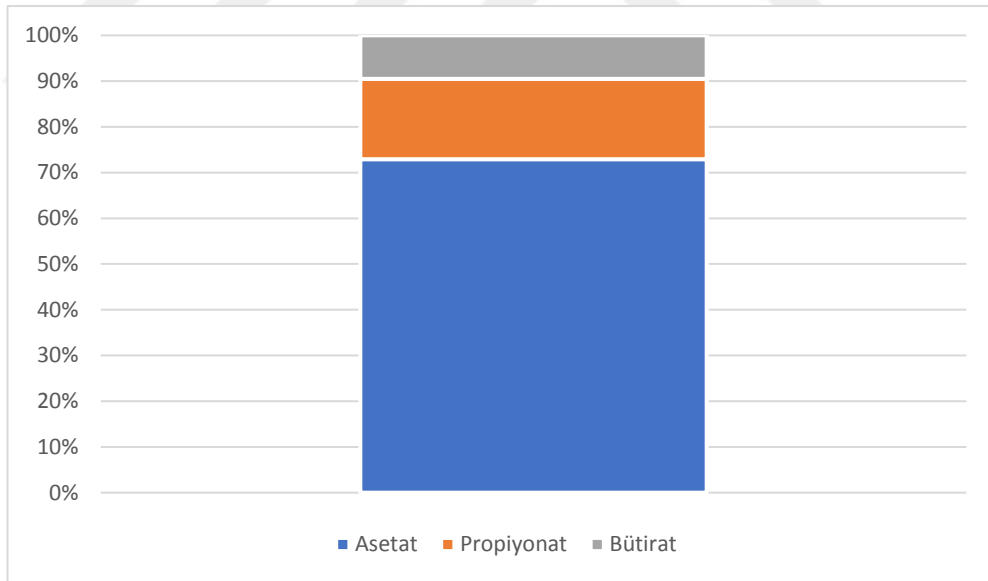
Şekil 3.18. Gruplara göre valerat miktarı.



Şekil 3.19. Gruplara göre izovalerat miktarı.



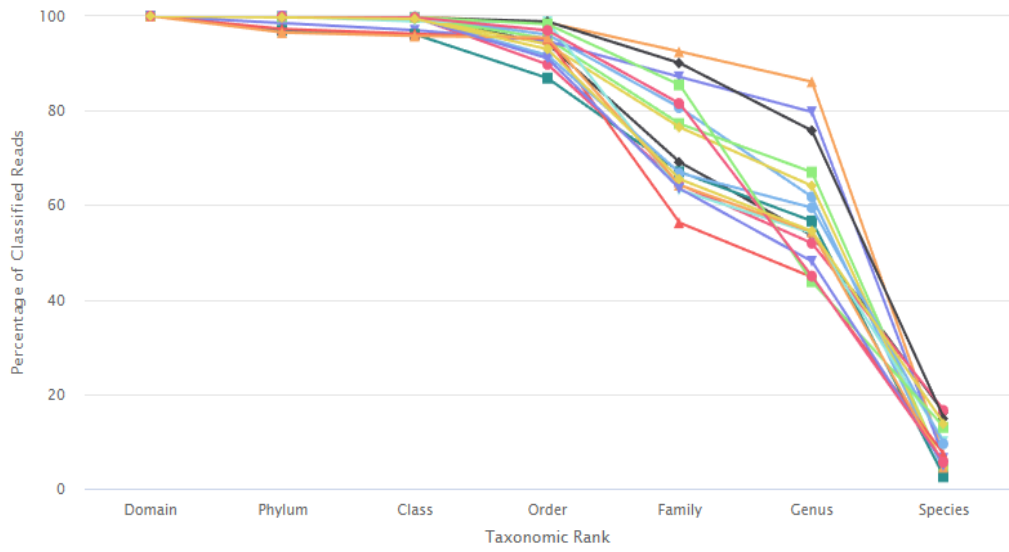
Şekil 3.20 Gruplara göre tUYA miktarı.



Şekil 3.21. Her iki grubu oluşturan köpeklerin dışısındaki Asetat/Propiyonat/Bütirat oranları.

ii. 16S rRNA Analiz Sonuçları

Kalite kontrolünden geçen okumalar, farklı taksonomik seviyelerde en yüksek benzerlik gösteren taksonomik birime atanmıştır. Şekil 3.22’de her bir örneğe ait okumaların farklı taksonomik basamaklardaki birimlere ne oranda tanımlanabildiği gösterilmektedir. Tür seviyesindeki düşüş metagenomik temelli çalışmalarda beklenen bir durumdur. Bu durum, bazı türlerde dizilenen genom bölgelerinin ayırıcı olmamasından kaynaklanmaktadır.

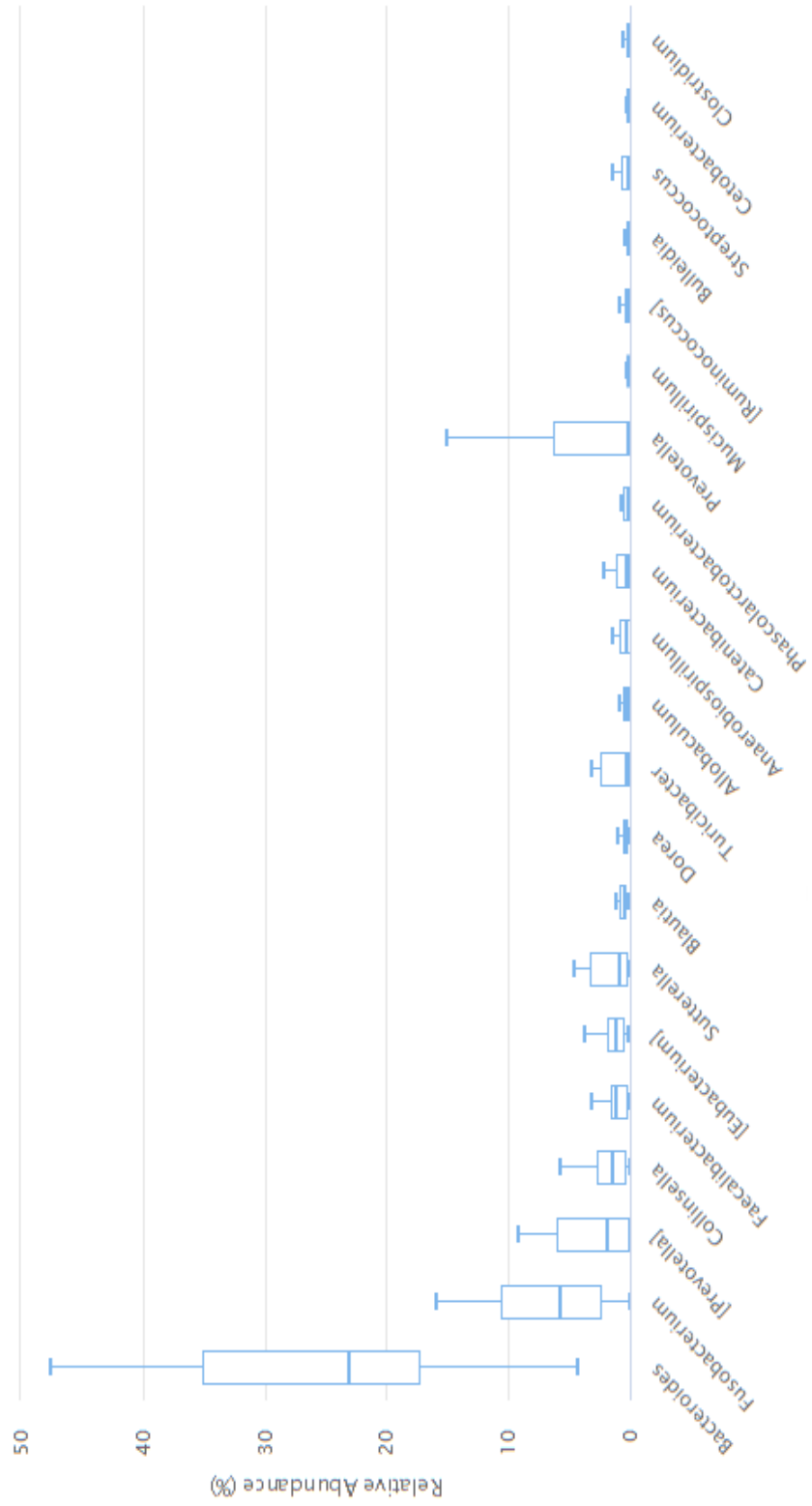


Şekil 3.22. Tanımlanan taksonomik basamaklar.

Tüm numunelerde en yüksek oranda görülen 20 cins Şekil 3.23.’de listelenmiştir. Sıralama, ilgili cinsin tüm örnekler dikkate alındığında, medyan değerine göre gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde her bir cinsin, minimum, maksimum, ortanca ve birinci/üçüncü çeyrek (quartile; Q) değerleri bulunmaktadır. Çizelge 3.3’te 20 türe ait minimum, maksimum, Q1 ve Q3 değerleri verilmiştir.

Çizelge 3.3. Tüm numunelerde en yüksek oranda görülen 20 cins.

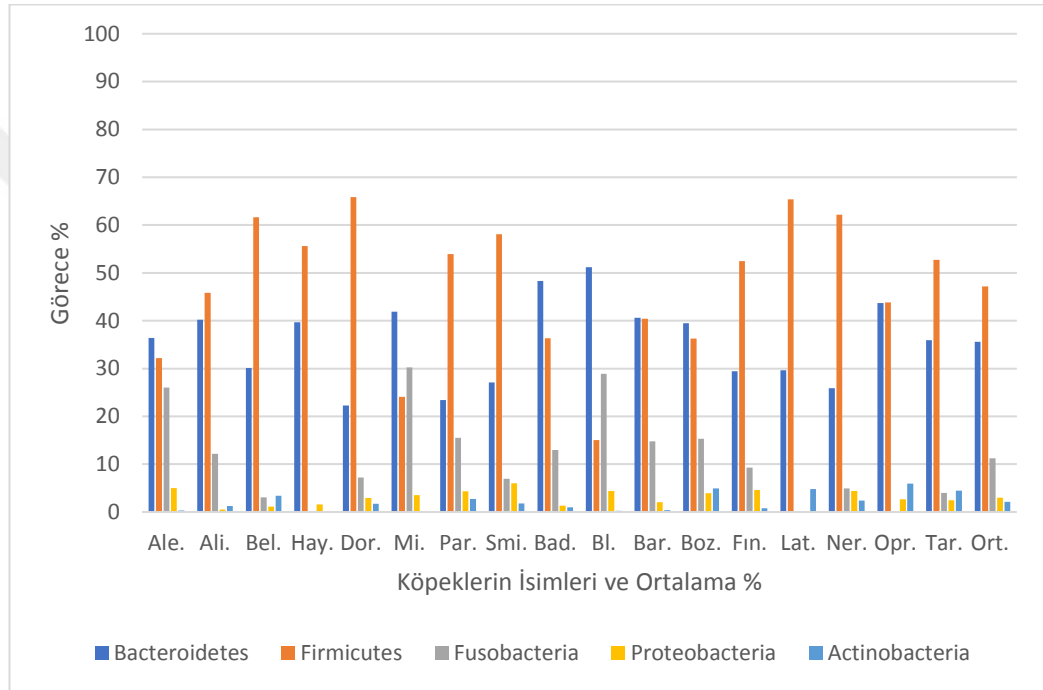
Kategori	Göreceli Çokluk (%)				
	Min.	Q1	Median	Q3	Mak.
<i>Bacteroides</i>	4,28	17,21	23,03	35,03	47,49
<i>Fusobacterium</i>	0	2,34	5,67	10,49	15,83
<i>[Prevotella]</i>	0	0,01	1,85	5,99	9,14
<i>Collinsella</i>	0	0,31	1,37	2,62	5,71
<i>Faecalibacterium</i>	0,01	0,22	1,12	1,52	3,1
<i>[Eubacterium]</i>	0,04	0,56	1,11	1,84	3,71
<i>Sutterella</i>	0	0,27	0,84	3,26	4,53
<i>Blautia</i>	0,1	0,33	0,46	0,72	1,13
<i>Dorea</i>	0,1	0,18	0,35	0,57	0,99
<i>Turicibacter</i>	0	0,05	0,32	2,43	3,12
<i>Allobaculum</i>	0,02	0,07	0,31	0,48	0,85
<i>Anaerobiospirillum</i>	0	0	0,26	0,72	1,42
<i>Catenibacterium</i>	0	0,01	0,23	1,04	2,1
<i>Phascolarctobacterium</i>	0	0,01	0,2	0,55	0,61
<i>Prevotella</i>	0,02	0,07	0,18	6,23	15,02
<i>Mucispirillum</i>	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17
<i>[Ruminococcus]</i>	0,04	0,13	0,16	0,38	0,73
<i>Bulleidia</i>	0	0,09	0,14	0,23	0,35
<i>Streptococcus</i>	0	0,04	0,14	0,6	1,42
<i>Cetobacterium</i>	0	0,03	0,12	0,18	0,23
<i>Clostridium</i>	0,05	0,09	0,12	0,27	0,51



Şekil 3.23. Örnek başına elde edilen ve cins seviyesinde tanımlanan ve tanımlanamayan okuma sayıları.

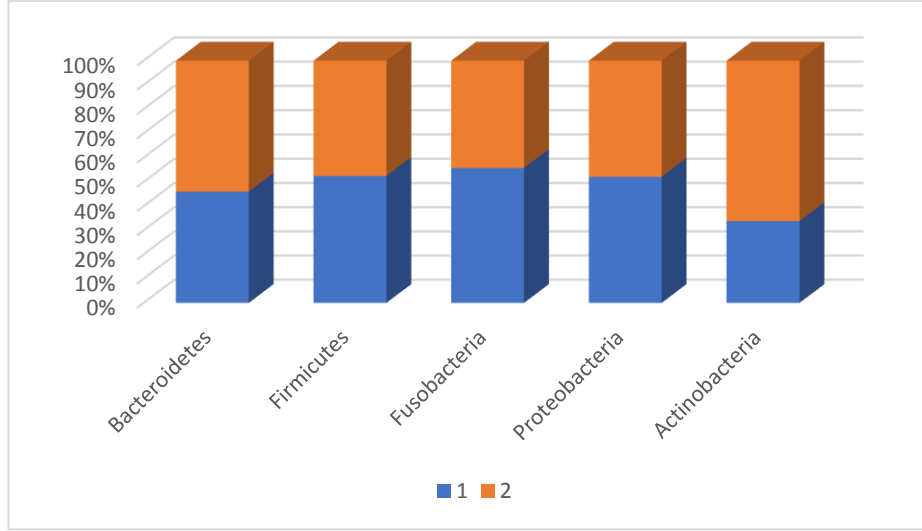
Filum:

Yapılan çalışmada bütün örneklem grubunda görülen 5 ana filum; Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria, Proteobacteria ve Actinobacteria olmuştur. Tüm köpeklerde ana bakteri filumlarının ortalama yüzdeleri; %47,16 Firmicutes, %35,6 Bacteroidetes, %11,26 Fusobacteria, %2,99 Proteobacteria ve %2,14 Actinobacteria olarak bulunmuştur (Şekil 3.24).



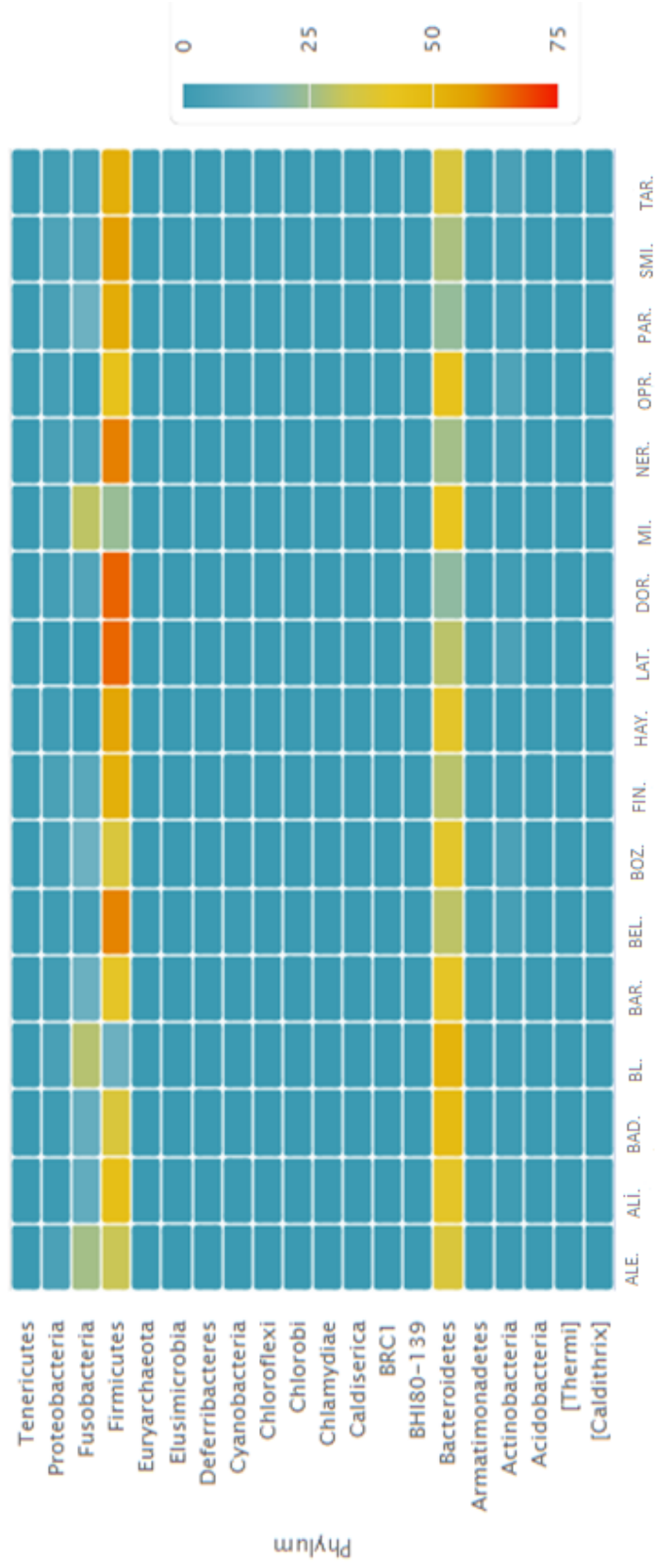
Şekil 3.24. Tüm köpeklerde görülen 5 ana filumun görece oranları (%).

Her yıl düzenli olarak aşılanan örneklem grubu ile en az 3 yıl önce aşılanmış örneklem grubu arasında görülen 5 ana filumun ortalama yüzdeleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Aşısız grupta Firmicutes, Fusobacteria ve Proteobacteria göreceli olarak daha yüksekken; aşılanan grupta Bacteroidetes ve Actinobacteria filumunun görece yüzdesinin daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 3.25). Filum seviyesinde yapılan gruplar arası karşılaştırmada anlamlı bir fark bulunamamıştır (T-test; $p \geq 0,05$).



Şekil 3.25. 1. (en az 3 yıl önce aşılanmış) ve 2. (her yıl düzenli olarak aşılanmış) grupta en fazla görülen 5 ana filumun görece yüzdeleri.

Tüm örnekler dikkate alındığında en yüksek oranda görülen filum *Firmicutes* ($52,45 \pm 14,78$) olarak belirlenmiştir. Metagenomik analiz sonucunda, tüm örneklerde toplamda 50 filum tespit edilmiştir. En yüksek oranda görülen 20 filum Şekil 3.26'da ısı grafiği şeklinde gösterilmiştir. Renk kodları maviden kırmızıya doğru, göreceli oran artacak şekilde kullanılmıştır. Beyaz renkli kutucuklar, o taksonun, ilgili örnekte hiç tespit edilmediğini göstermektedir.

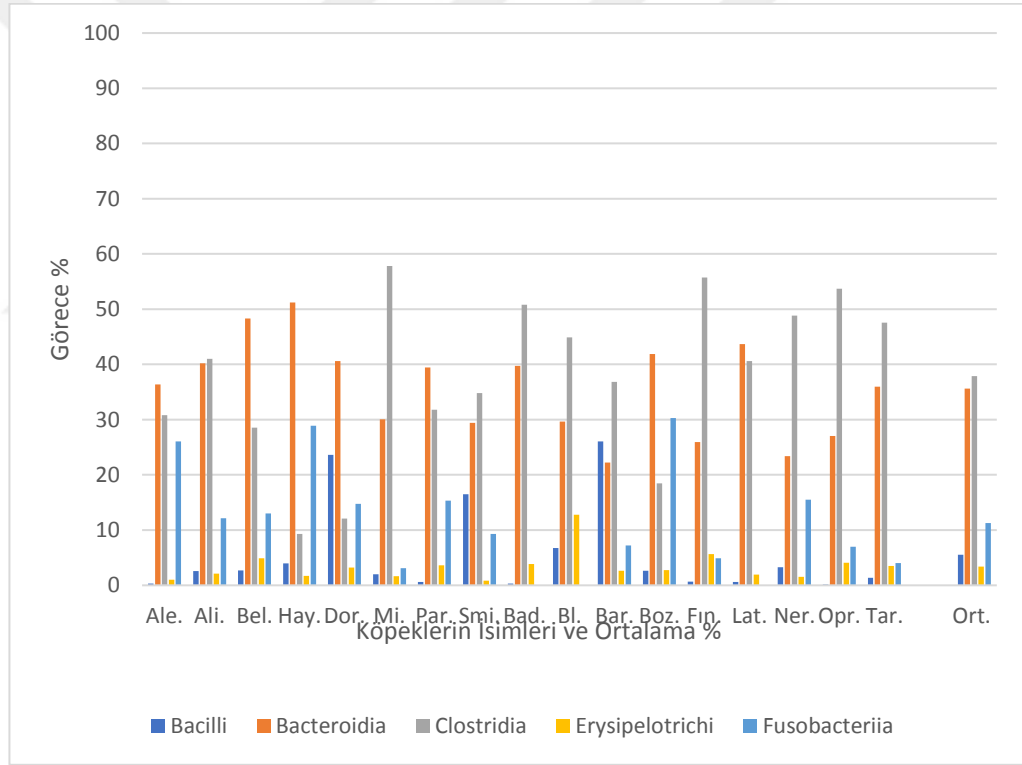


Şekil 3.26. En yüksek oranda görülen filumların dağılımları.

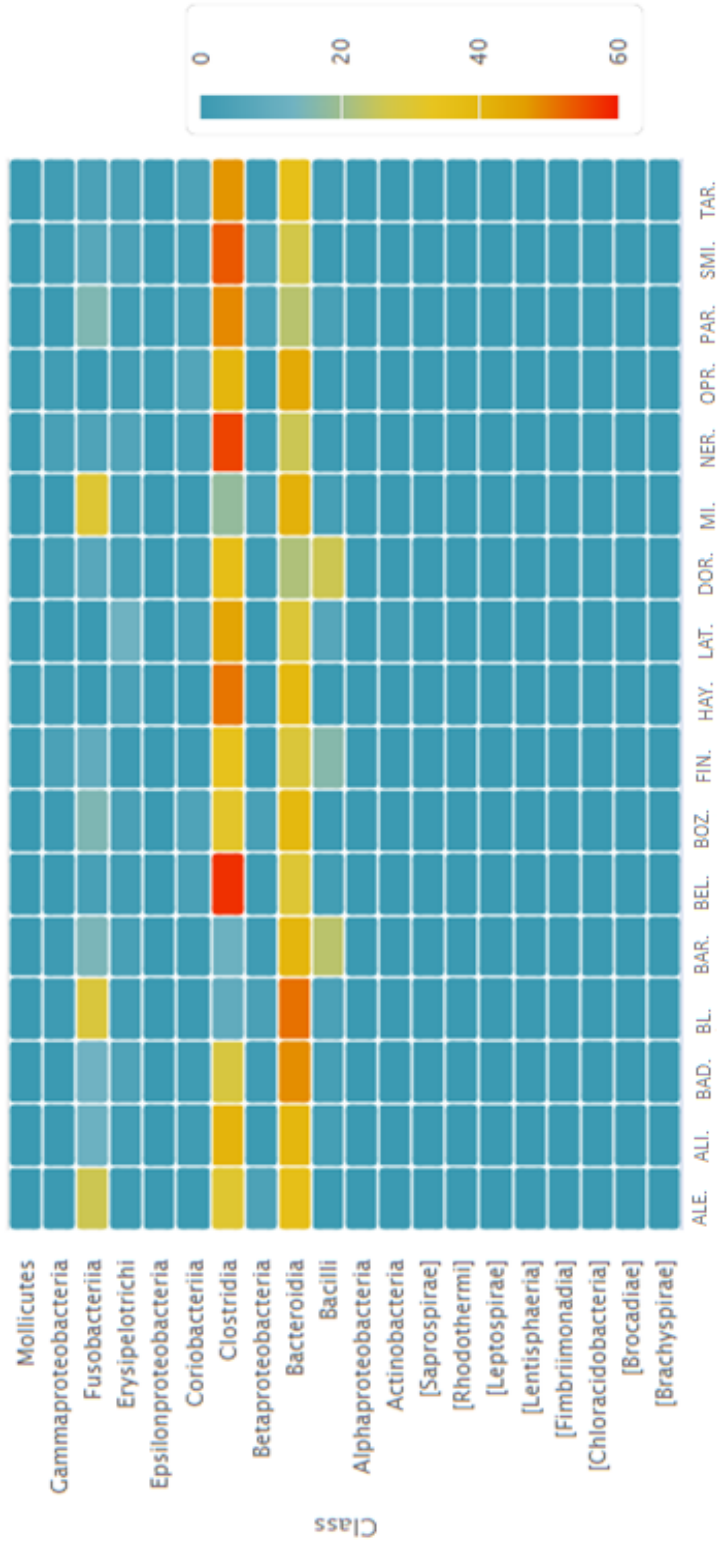
Sınıf:

Yapılan çalışmada metagenomik analiz sonucu tüm örneklerde toplam 128 sınıf tespit edilmiştir. Her iki gruptan toplanan numunelerde en fazla görülen 5 sınıf; Clostridia, Bacteroidia, Fusobacteriia, Bacilli ve Erysipelotrichi olmuştur (Şekil 3.27).

En yüksek oranda görülen 20 sınıfın ısı grafiği ise Şekil 3.28’de gösterilmiştir. Tüm örnekler dikkate alındığında en yüksek oranda görülen takson *Clostridia* (%40,63 ± 14,7) olarak belirlenmiştir.



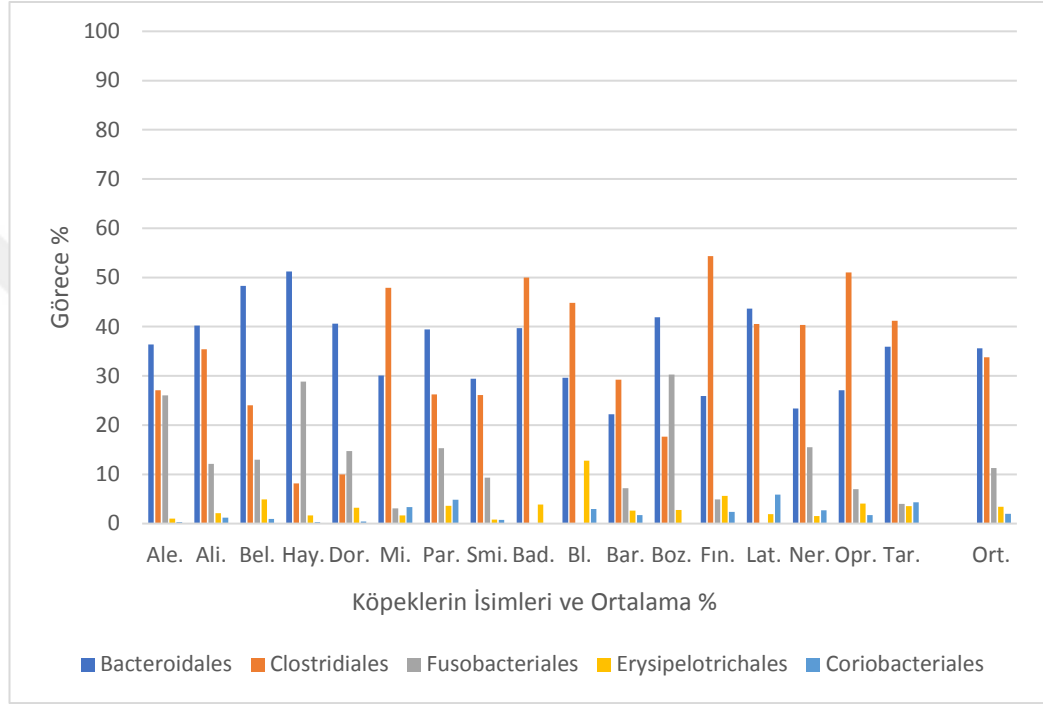
Şekil 3.27. Tüm köpeklerde en fazla görülen 5 sınıfın görece oranları (%).



Şekil 3.28. En yüksek oranda görülen sınıfların dağılımları.

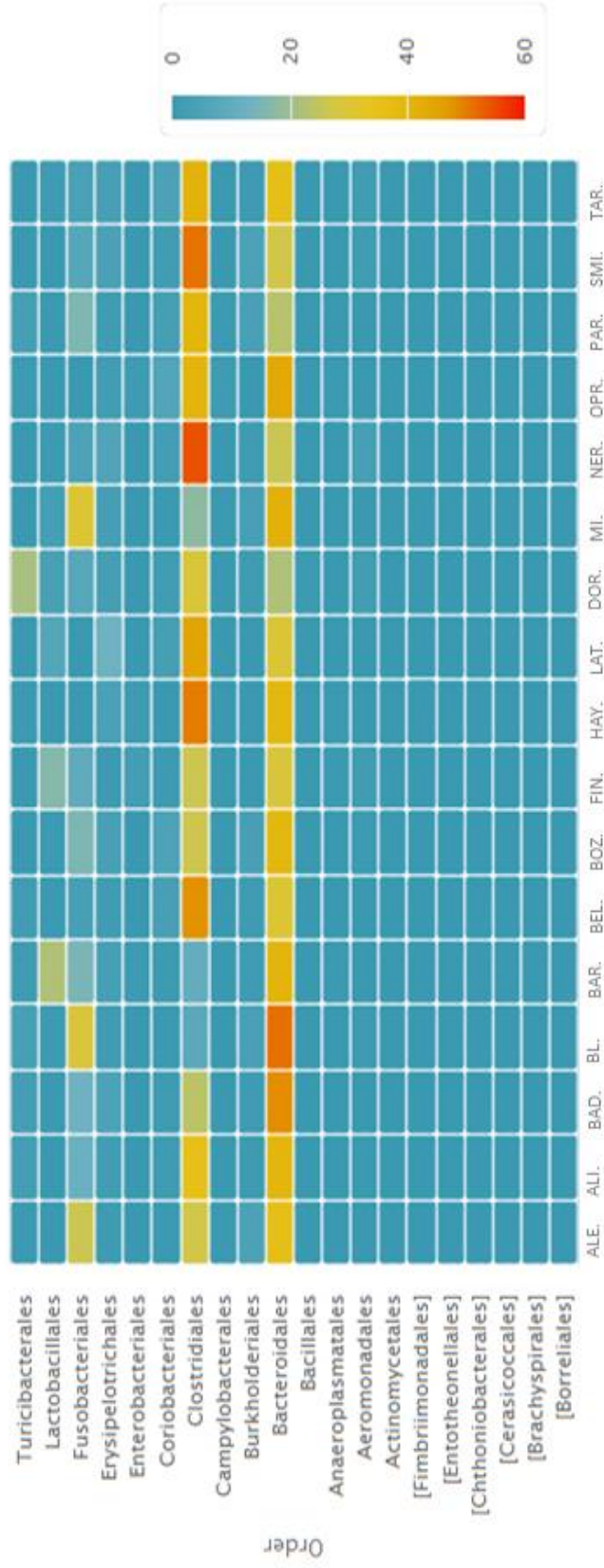
Takım:

Yapılan çalışmada metagenomik analiz sonucu tüm örneklerde toplam 206 takım tespit edilmiştir. Her iki gruptan toplanan numunelerde en fazla görülen 5 takım; Bacteroidales, Clostridiales, Fusobacteriales, Erysipelotrichales ve Coriobacteriales olmuştur (Şekil 3.29).



Şekil 3.29. Tüm köpeklerde en fazla görülen 5 takımın görece oranları (%).

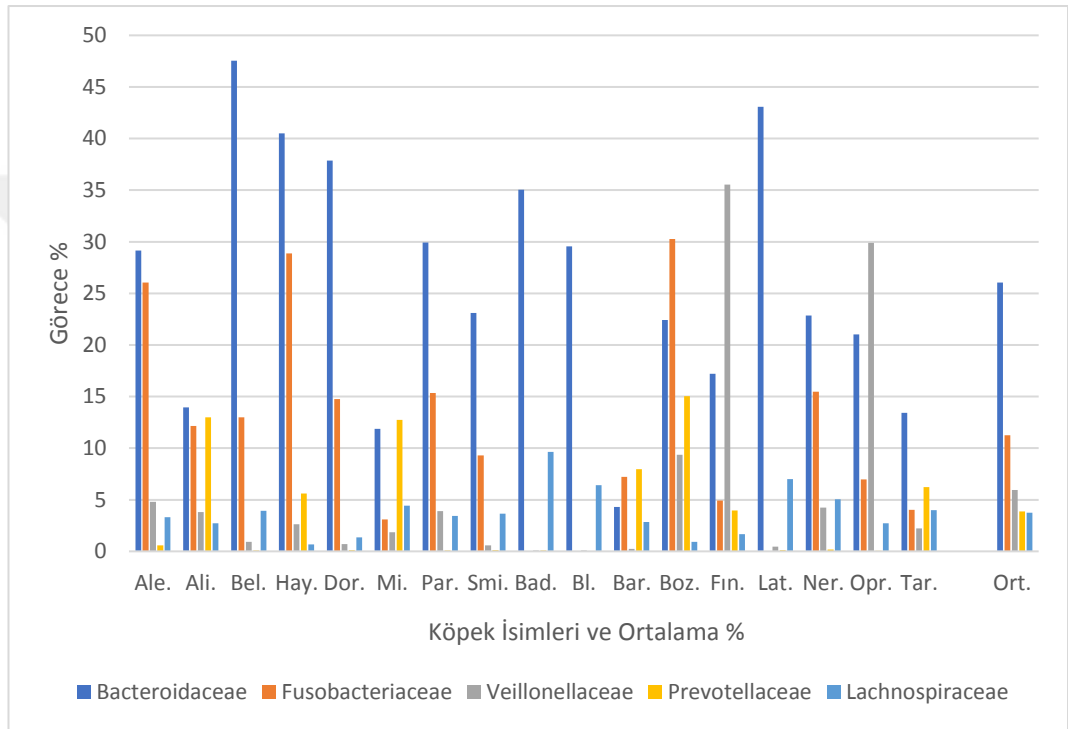
Metagenomik analiz sonucunda en yüksek oranda görülen 20 takım ısı grafiği şekilde Şekil 3.30.'da gösterilmiştir. Tüm örnekler dikkate alındığında en yüksek oranda görülen takson *Bacteroidales* (%36,38 $\pm$ 8,61) olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.30. En yüksek oranda görülen takımların dağılımları.

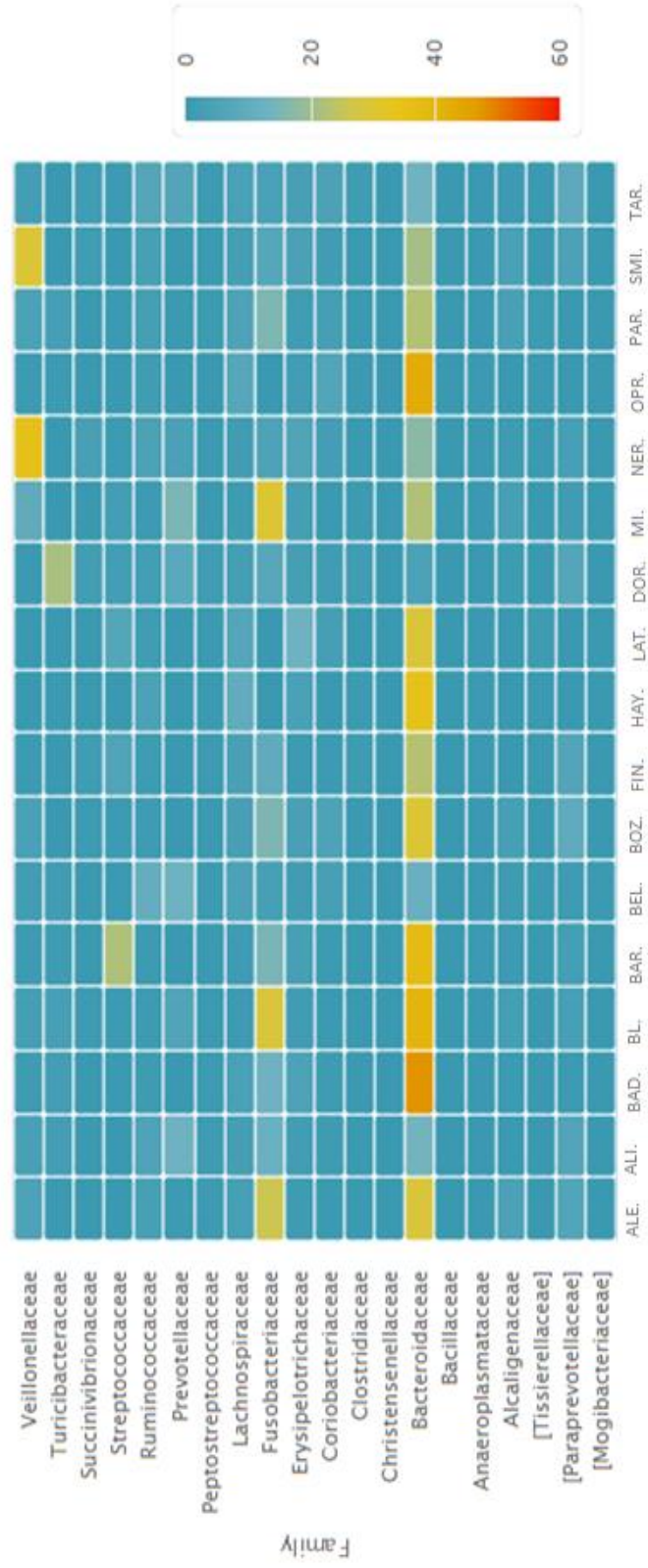
Familiya:

Yapılan çalışmada metagenomik analiz sonucu tüm örneklerde toplam 288 familiya tespit edilmiştir. Her iki gruptan toplanan numunelerde en fazla görülen 5 familiya; *Bacteroidaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Veillonellaceae*, *Prevotellaceae* ve *Lachnospiraceae* olmuştur (Şekil 3.31).



Şekil 3.31. Tüm köpeklerde en fazla görülen 5 familiyanın görece oranları (%).

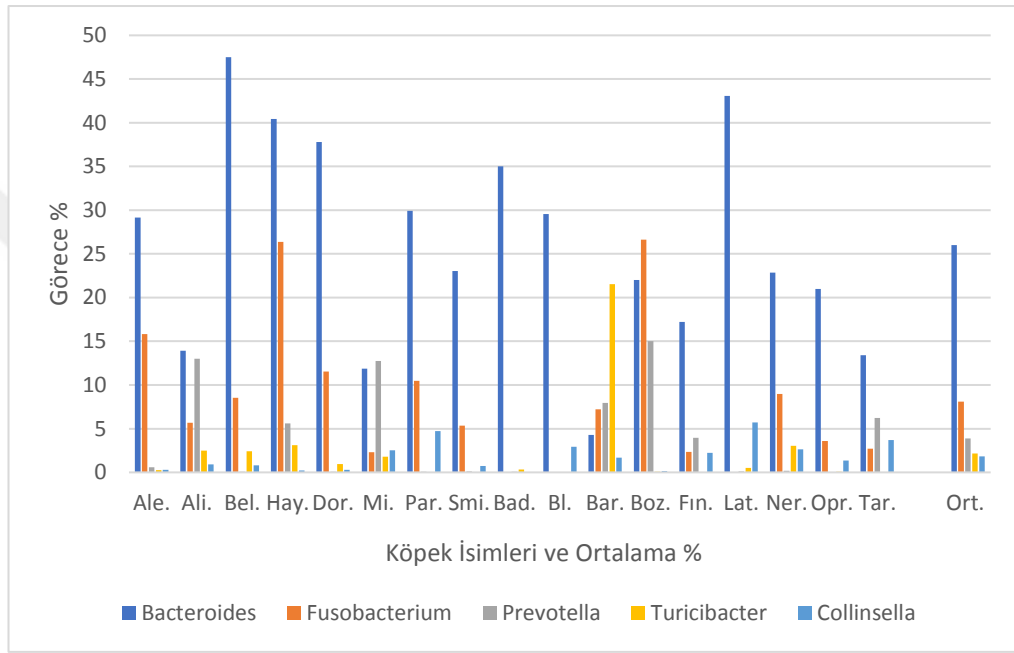
Metagenomik analiz sonucu en yüksek oranda görülen 20 familiya Şekil 3.32'deki ısı grafiğinde gösterilmiştir. Tüm örnekler dikkate alındığında en yüksek oranda görülen takson *Bacteroidaceae* ($52,45 \pm 12,08$) olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.32. En yüksek oranda görülen familyaların dağılımları.

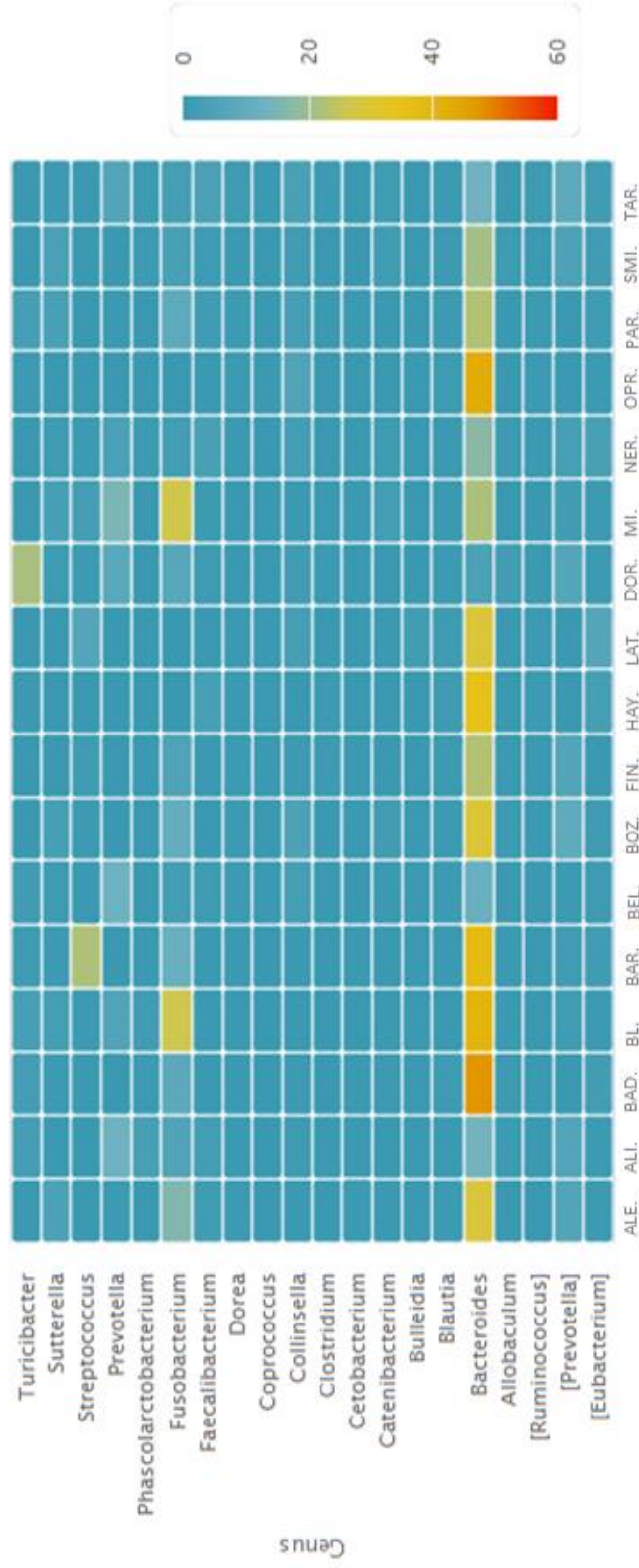
Cins:

Yapılan çalışmada metagenomik analiz sonucu tüm örneklerde toplam 488 cins tespit edilmiştir. Her iki gruptan toplanan numunelerde en fazla görülen 5 cins; *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Turicibacter* ve *Collinsella* olmuştur (Şekil 3.33).



Şekil 3.33. Tüm köpeklerde en fazla görülen 5 cinsin görece oranları (%).

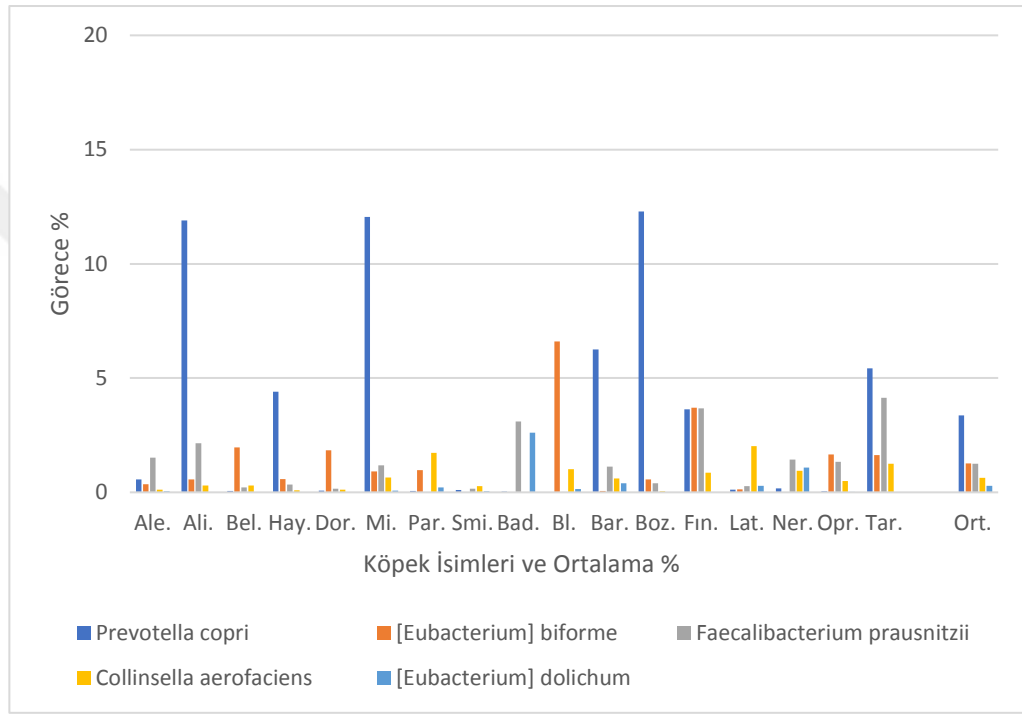
Metagenomik analiz sonucu en yüksek oranda görülen 20 cins Şekil 3.34'teki ısı grafiğinde gösterilmiştir. Tüm örnekler dikkate alındığında en yüksek oranda görülen takson *Bacteroides* ($23,03 \pm 12,08$) olarak belirlenmiştir. Cins seviyesinde yapılan gruplar arası karşılaştırmada anlamlı bir fark bulunamamıştır (T-test; $p \geq 0,05$).



Şekil 3.34. En yüksek oranda görülen cinslerin dağılımları.

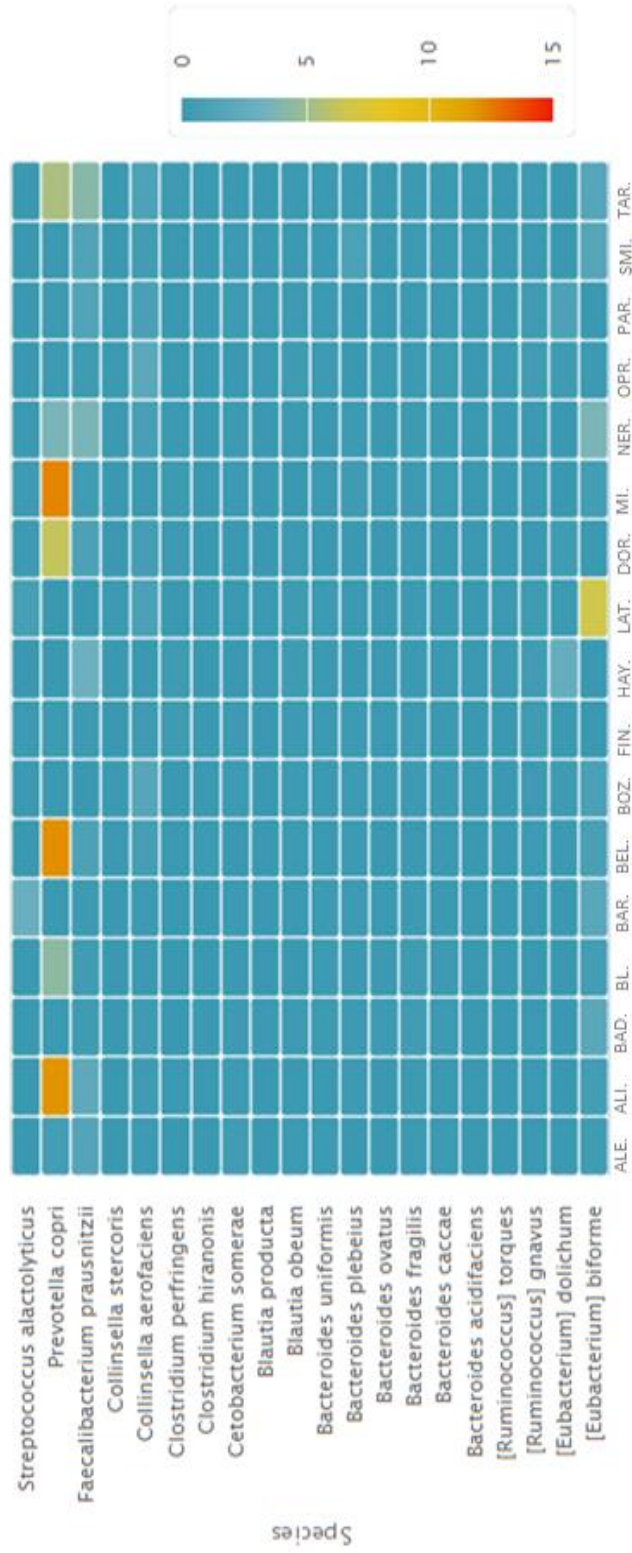
Tür:

Yapılan çalışmada metagenomik analiz sonucu tüm örneklerde toplam 215 tür tespit edilmiştir. Her iki gruptan toplanan numunelerde en fazla görülen 5 tür; *Prevotella copri*, *Eubacterium biforme*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Collinsella aerofaciens* ve *Eubacterium dolichum* olmuştur (Şekil 3.35).



Şekil 3.35. Tüm köpeklerde en fazla görülen 5 türün görece oranları (%).

Metagenomik analiz sonucu en yüksek oranda görülen 20 tür Şekil 3.36'daki ısı grafiğinde gösterilmiştir. Tüm örnekler dikkate alındığında en yüksek oranda görülen takson *Prevotella copri* (%3,36) olarak belirlenmiştir. Tür seviyesinde yapılan gruplar arası karşılaştırmada anlamlı bir fark bulunamamıştır (T-test; $p \geq 0,05$).

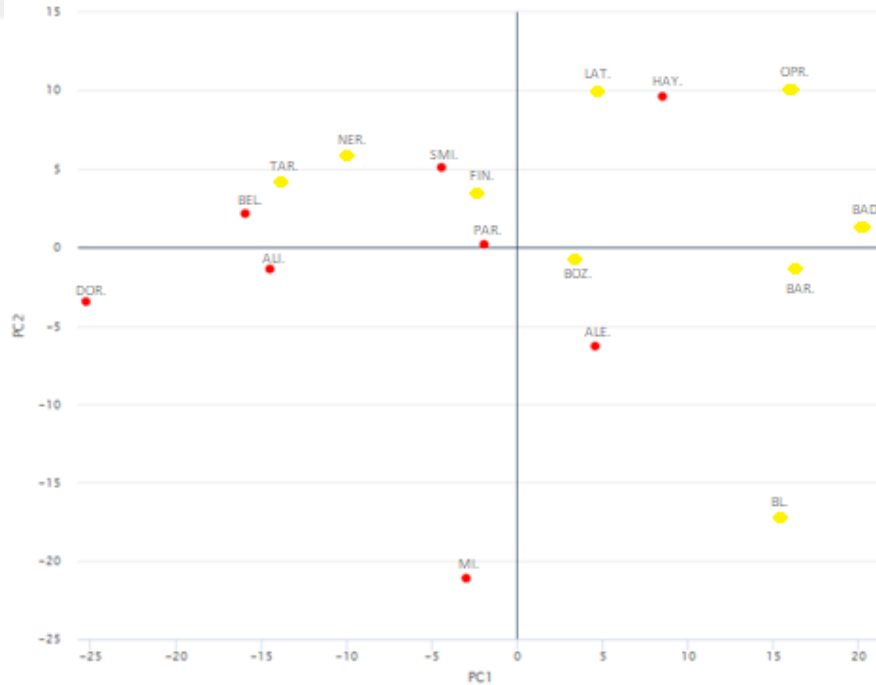


Şekil 3.36. En yüksek oranda görülen türlerin dağılımları.

Temel Bileşen Analizi (PCA):

Tüm örneklerin normalleştirilmiş göreceli mikrobiyal çeşitliliği, Temel Bileşen Analizi (Principal Coordinate Analysis; PCA) yaklaşımı ile gösterilmiştir. PCA, numuneler arasında taksonomik sınıflandırma dağılımındaki sabit taksonomik seviyeye kadar olan farkları ölçmektedir. Dağılım içinde, küme oluşturan örnekler, benzer mikrobiyal dağılım göstermektedir.

Mikrobiyal çeşitlilik analizine yönelik profil benzerliklerinin en iyi şekilde anlaşılmasını sağlayan yaklaşımlardan biri PCA grafiğidir. Bu görselleştirme, numuneler arasında ön bilgi olmadan benzerlikler ve farklılıkların görselleştirilmesini sağlar. Şekil 3.37’de projede analiz edilen örneklerin en yüksek oranda görülen 30 cins dikkate alındığında PCA sonrası PC1 ve PC2 düzlemindeki dağılımları görülmektedir. PCA hesaplanmasında, cins basamağındaki mikrobiyal profil esas alınmıştır.



Şekil 3.37. Örneklerin PCA sonrası PC1 ve PC2 düzlemindeki dağılımları

Çeşitlilik:

Çeşitlilik indeksi (alpha diversity veya filogenetik metrikler olarak da adlandırılır), bir veri kümesinde kaç farklı organizmanın bulunduğunu ve aynı zamanda bireyler arasındaki filogenetik ilişkileri (eş-dağılım, tür yakınlığı, tür zenginliğini) yansıtan nicel bir ölçüdür. Proje kapsamında, çeşitlilik hesaplamasında Shannon (Shannon ve Fedor, 2003) ve Simpson indeksleri (Simpson, 1949) kullanılmıştır. Çizelge 3.4'te her bir türün Shannon ve Simpson indeksleri ve tespit edilen türlerin sayısı belirtilmiştir.

Çizelge 3.4. Örneklem grubunu oluşturan köpeklerin Shannon ve Simpson İndeksleri ve cins sayıları.

	Shannon İndeksi	Simpson İndeksi	Cins Sayısı
Ale.	1,63	0,7	49
Ali.	2,26	0,84	52
Bad.	1,24	0,48	45
Bl.	1,59	0,68	49
Bar.	1,48	0,67	47
Bel.	2,5	0,86	56
Boz.	1,77	0,73	43
Fın.	2,22	0,8	62
Hay.	0,99	0,38	36
Lat.	1,63	0,66	37
Dor.	2,2	0,82	53
Mı.	1,68	0,75	38
Ner.	2,26	0,81	45
Opr.	0,95	0,36	48
Par.	1,86	0,72	48
Smi.	2,1	0,75	46
Tar.	2,58	0,88	60

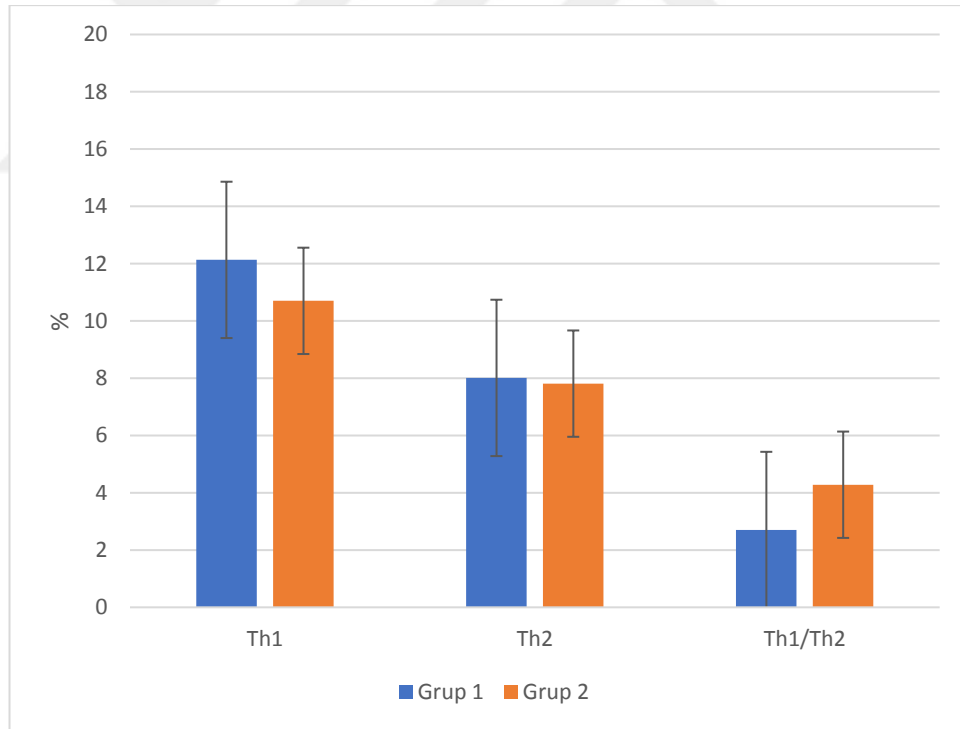
Köpeklerin Mikrobiyota Profilleri ve Nesne Seçim Testi Performansları Arasındaki İlişki:

Köpeklerin mikrobiyota profilleri ve nesne seçim testi performansları arasındaki ilişki incelendiğinde Actinobacteria ve Coriobacteria ile performans arasında anlamlı bir ilişki olduğu değerlendirilmiştir (MANOVA, $p \leq 0,05$). Buna

göre, Actinobacteria ve Coriobacteria popülasyonundaki artışın bellek testi performansındaki azalma ile ilişkili olduğu belirlenmiştir.

3.5. Bağışıklık ile İlgili Sonuçlar

Flow sitometri analiz sonucuna göre en az 3 yıl önce aşılanmış (Grup 1) köpekler ile her yıl düzenli olarak aşılanmış (Grup 2) köpekler arasında Th1:Th2 oranlarında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu durum da yıllık uygulanan aşılamanın immun sistemin hazırlanması üzerinde negatif bir etkisinin olmadığını düşündürmektedir. Şekil 3.38’de 1. ve 2. grup arasında Th1, Th2 ve Th1:Th2 oranının yüzde değerleri belirtilmiştir. Çizelge 3.5’te iki grup arasındaki Th1, Th2 ve Th1/Th2 değerlerinin ortalama yüzdeleri karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.38. Grup 1 ve Grup 2’yi oluşturan köpeklerin Th1, Th2 ve Th1:Th2 değerlerinin karşılaştırılması (%).

Çizelge 3.5. Grup 1 ve Grup 2 arasında Th1 ve Th2 yüzdelerinin karşılaştırılması (mean $\pm$ S.D.).

Grup	Th1(%)	Th2(%)	Th1/Th2
1 (n:8)	12,12 $\pm$ 7,95	8,01 $\pm$ 4,76	2,70 $\pm$ 3,08
2 (n:10)	10,69 $\pm$ 11,69	7,81 $\pm$ 4,42	4,28 $\pm$ 9,48



4. TARTIŞMA

Bu tez çalışması, yaşlı köpeklerde yıllık ve düzenli aşılamamanın bilişsel fonksiyon, kaygı durumu, bağışıklık sistemi ve mikrobiyota üzerine etkilerinin araştırılmasını amaçlamaktadır. Köpeklerde yıllık aşılamamanın olası yan etkileri ile ilgili ilk akademik tartışmaların odağında Green ve ark. (2001) tarafından yayınlanan bir derleme yer almaktadır. Green ve ark (2001), yıllık aşılama ile ilgili endişelerini şu şekilde ifade etmektedir: *“Veteriner hekimlik mesleği tarafından yıllardır benimsenen neredeyse tüm köpek aşılarının yetişkin köpeklere yıllık olarak uygulanması önerisi dikkat çekicidir. Bununla birlikte, bugün köpeklere uygulanan çoğu aşı için, bağışıklığın 12 ay sürdüğünü kanıtlayan hiçbir bilimsel çalışma bulunmamaktadır. Bugün kullanılan çoğu aşı için yapılan aşı etkinlik çalışmaları, son aşılamadan sadece 3 ila 4 hafta sonra aşılanmış hayvanları test etmiştir. Yetişkin köpeklerin ve kedilerin, yaygın olarak uygulanan tüm aşılar için yıllık takviyelere ihtiyaç duyduğu paradigma sorgulanmaktadır. Üründeki aşı antijenlerinin sayısı ve türü göz önüne alınmadan ve bireysel olarak hayvanın enfeksiyon riskini gerçekçi bir şekilde değerlendirmeden aşıları keyfi olarak uygulamaya devam edemeyiz”*. Gerçekten de bugüne kadar yapılan araştırmalarda aşıların pet hayvanlarında özellikle bağışıklık ve inflamatuvar yollar üzerine önemli yan etkilerinin ortaya konulmasına rağmen bu konunun detaylı ve bütüncül bir yaklaşımla ortaya konulmamış olması literatürde önemli bir eksiklik olarak dikkati çekmektedir (Roth ve ark., 1999; Strasser ve ark., 2003). Mevcut tez çalışması literatürdeki bu açığı kapatmak için gerçekleştirilmiş olup yaşlı köpeklerde yıllık aşılamamanın multisistemik etkilerini araştırması açısından öncü bir çalışma niteliğindedir.

Bu tez çalışmasında, yıllık aşılamamanın senyör köpeklerde bilişsel fonksiyon ve kaygı durumu üzerine etkilerinin araştırılması için çok aşamalı bir yaklaşım benimsenmiştir.

Yaşlanma, moleküler, hücresel ve fizyolojik süreçleri etkileyen ve dolayısıyla hastalık riskini artıran ve hayatta kalma ile üreme gibi özellikler üzerinde negatif etkiye sebep olan doğal bir süreçtir (Ruple ve ark., 2022). Bu araştırmanın köpeklerle odaklanması, sadece veteriner bilimi açısından değil insan araştırmaları için de önem arz etmektedir. Nitekim köpekler, insanlarda yaşlanma ve yaşam süresini uzatmayı amaçlayan çalışmalar için basit organizmalar ile yapılan çalışmaların limitasyonları ve insanlarda çalışma yürütmenin zorlukları göz önüne alındığında en uygun biogerontoloji modeli olarak değerlendirilmektedir (Head, 2011; Jones ve ark., 2018; Ruple ve ark., 2022; Sándor ve Kubinyi, 2019).

Köpeklerin aşağıda belirtilen eşsiz özellikleri nedeniyle özellikle yaşlanma ile ilgili çalışmalarda önemli modeller oldukları düşünülmektedir:

1. Köpekler insanlara göre ortalama 6-7 kat daha hızlı yaşlanmaktadır. Bu durum da yapılan çalışmalarda takip kolaylığı sağlamaktadır (Sándor ve Kubinyi, 2019).

2. Köpeklerin ortalama yaşam süresinin vahşi kurtlara kıyasla iki katına çıkması insanlar ile köpeklerin ortak yaşam paydalarını artırmaktadır (Mech, 2006). Yapılan çalışmalarda köpeklerin yaşam süresinin vücut büyüklüğüne ve ırka bağlı olarak 5,5 ila 14,5 yıl arasında değişiklik gösterdiği belirlenmiştir (Jimenez, 2016; Michell, 1999; O'Neill ve ark., 2013). Yaşam süresinde şekillenen bu artış, insanlarda yaşlanmayla birlikte şekillenen hastalıklarda ortaya çıkan patolojilere güçlü benzerlikler gösterme oranını artırarak translasyonel çalışmalar için avantaj sağlayabilmektedir (Sándor ve Kubinyi, 2019).

3. Tüm yaşlı köpekleri etkilemese de yaşla birlikte köpekler bilişsel gerileme belirtileri geliştirebilmektedir (Bosch ve ark., 2012; Cotman ve Head, 2008; Landsberg ve Ruehl, 1997; Landsberg ve ark., 2010, Landsberg ve ark., 2012;). Köpekler, insanlarda şekillenen Alzheimer hastalığına benzer nörodejeneratif bozuklukları geliştirmeye yatkın türlerdir. 11-12 yaşındaki köpeklerin neredeyse 1/3'ünün ve 15-16 yaşındaki köpeklerin %70'inin insanlarda senil demans

semptomlarına karşılık gelen kognitif bozukluk gösterdiği bildirilmiştir (Neilson ve ark., 2001). Bilişsel süreçte gözlenen progresif patolojik durum "Köpeklerde Bilişsel Fonksiyon Bozukluğu Sendromu" olarak isimlendirilir (Cummings ve ark., 1996; Landsberg ve ark., 2012). Köpeklerde bilişsel fonksiyon bozukluğu, prefrontal kortekste β -amiloid senil plak oluşumu, locus coeruleus'ta noradrenerjik nöron kaybı (Insua ve ark., 2010) ve köpeklerde tam olarak gelişmiş nörofibriler yumak oluşumu şekillenmese bile son zamanlarda yapılan çalışmalar ile sinaptozomlarda hiperfosforile tau protein düğümlerinin oluşumu (Schmidt ve ark., 2015; Smolek ve ark., 2016) insanlarda erken evre nörodejeneratif hastalıklarda görülebilmektedir.

4. Köpekler, evcilleştirmenin bir sonucu olarak çeşitli metabolik ve fizyolojik özellikler açısından insanlardaki süreçlere benzerlik göstermektedir (Axelsson ve ark., 2013). Bu nedenle, kullanılan birçok ilacın ve gıda takviyesinin intestinal absorpsiyon profilinin köpeklerde ve insanlarda çok benzer olduğu bilinmektedir (Roudebush ve ark., 2005).

5. Yapılan çeşitli araştırmalar, köpeklerin iletişim ve öğrenme konusunda insanların sosyal becerilerine benzer kognitif yeteneklere sahip olduğu fikrini desteklemektedir (Bensky ve ark., 2013; Miklósi, 2014; Topál ve ark., 2009). Köpeklerin genellikle insanlarla iç içe bir yaşam sürmeleri onların birçok insan davranışını kolayca yorumlayabilmelerini sağlamaktadır (Miklósi ve Kubinyi, 2016).

6. Köpekler, rodentlere kıyasla insanlarla daha fazla genomik sekans paylaşmaktadır (Lindblad-Toh ve ark., 2005). Bu durum, genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) için başarı şansını artırmaktadır (Boyko, 2011; Vaysse ve ark., 2011; Hayward ve ark., 2016; Schoenebeck ve Ostrander, 2014). Aynı zamanda yapılan çalışmalar köpeklerdeki intestinal mikrobiyotanın rodent modellerine kıyasla insanlarda görülen intestinal mikrobiyota, bileşimine ve işlevselliğine daha yakın olduğunu göstermektedir (Ambrosini ve ark., 2019). Rodent diyetlerinin insan besinlerinden önemli ölçüde farklı oluşu ve beslenmenin mikrobiyotanın gelişimi açısından önemli bir çevresel faktör oluşu nedeni ile farklı mikrobiyal kompozisyon içeren türler arasındaki beslenmenin etkisini karşılaştırmak

deney hayvanları ile yapılan çalışmaların kısıtlayıcı faktörlerini oluşturmaktadır (Flint, 2011; Ravussin ve ark., 2012). Örneğin düşük askorbik asit içeriğine sahip tahıl ürünleri ile tercihen beslenen fareler, bu temel kofaktörü sentezleyebilme yeteneği kazanırken, insanların omnivor oldukları için bu yeteneğe sahip olmadığı belirtilmektedir (Perlman, 2016).

Rodent modellerinin insan patofizyolojisinin yönlerini yeterince yansıtmadığını düşündüren başka bir faktör, bazı modellerin amiloidozis geliştirme eğiliminin sınırlı olması ile ilişkilidir. Rodent modellerinin doğal olarak insan dizisi A β üretemediği belirlenmiş olduğu için (Shepherd ve ark., 2018), onların translasyonel bir model olarak araştırma faydalarını sınırladığı düşünülmektedir (Ambrosini ve ark., 2019). Presenilin 1 (PS1) ve presenilin 2 (PS2) ile kombine edilen transgenik fare modelleri, beyinde, histolojik olarak AD'yi taklit eden sekonder A β plak oluşumuna sahiptir (Götz ve ark., 2008). Ancak bu transgenik fare modellerinin A β patolojisine karşı moleküler ve sistemik dirence doğal olarak sahip olduğu ve bu nedenle insan AD hastalarında görülen geniş nöronal kayıp ve klinik bulguları geliştiremeyeceği düşünülmektedir (Martin ve ark., 2011). Ayrıca rodentler ve insanlar arasında serebral korteksin anatomik olarak kıvrımında temel bir fark vardır, insanlar gyrencefalik bir beyine sahip iken rodentler lisensefalik bir beyin yapısına sahiptir (Sun ve Hevner, 2014).

Yakın tarihte yapılan bir meta-analiz çalışması, spontan AD hastalarından elde edilen bulgular ile transgenik AD fare modellerindeki bulguların tutarlı olmadığını ayrıca majör transgenik AD fare modelleri arasında da bulguların birbiri ile benzer olmadığını ortaya koymuştur (Hargis ve Blalock, 2017). Elde edilen veriler köpeklerin yaşlanmanın nörolojik hastalıkların gelişimine ve tedavisine olan etkisini araştırmak için transgenik fare modellerine göre daha üstün bir hastalık modeli sistemi sağladığını göstermektedir (Head, 2013). Köpeklerin tüm faktörler göz önüne alındığında ve insanlarla paylaştığı çevresel, genomik ve intestinal fizyolojik özellikleri nedeniyle translasyonel açıdan daha uygun bir tür olduğu düşünülmektedir (Cummings ve ark., 1996).

Köpeklerin ideal bir yaşlanma modeli olduğunu savunan bir başka çalışmada 5-9 yaş arasındaki beagle'larda gözlenen bilişsel fonksiyon bozukluğu ile 40-60 yaş arasındaki insanlarda gözlenen bilişsel fonksiyon bozukluğunun paralel bir yaşlanma süreci gösterdiği belirlenmiştir (Patronek ve ark., 1997). Bu çalışmalara ek olarak, beyin/beden büyüklüğü oranının, farelere kıyasla insanlar ve köpekler arasında daha uygun bir şekilde karşılaştırılabileceği üzerinde durulmuştur (Roth ve Dicke, 2005) ve bu durum köpek beynini nörolojik hastalıklar için hasta hayvan modeli olarak kullanmanın bir başka avantajıdır (Ambrosini ve ark., 2019).

7. Ev ortamında yaşayan köpeklerin popülasyonun oldukça fazla olması ve kolay ulaşılabilir olması, köpek sahipleri ve veteriner hekimlerin yardımıyla geniş veri tabanı sağlamaya yardımcı olmaktadır (Hecht ve Rice, 2015; Sándor ve Kubinyi, 2019; Stewart ve ark., 2015).

Yaşlı köpeklerde bilişsel fonksiyon bozukluğunun değerlendirilmesinde hasta sahiplerinden alınan ayrıntılı bir anamnez ve genel muayene bulguları oldukça önemlidir. Temel olarak genel muayene; kilo ölçümü, vücut kondisyon skorunun belirlenmesi, hipertansiyon durumunun olup olmadığını anlamak için kan basıncı ölçümü, nörolojik ve oftalmolojik muayeneyi ve duyu testlerini içermelidir. Ayrıca laboratuvar analizleri için kan ve idrar örneklerinin alınması gerekmektedir. Tam kan sayımı, serum biyokimya analizi, idrar tahlili ve tiroid profili, geriatric hastalarda değerli olabilecek laboratuvar testlerindendir. Ayrıca köpeklerde bilişsel fonksiyon bozukluğu değerlendirmesi yapılırken ortopedik muayenenin de planlanması yaşla birlikte artış gösteren ve ağrı ile ilişkili olabilecek bazı hastalıkların ayırıcı tanısının gerçekleştirilmesine yardımcı olur. Bir hastalık durumundan şüphelenilirse bu durumu doğrulamak için radyografi, ultrasonografi veya serolojik testler gibi ileri tetkikler yapılabilir. Medikal bir durum tespit edilmezse, bilişsel fonksiyon bozukluğunu teşhis etmek için davranışsal muayenenin yapılması ve bu şekilde bir değerlendirme yapılması gerekmektedir (Rajapaksha, 2018).

Evcil hayvanların bilişsel fonksiyon durumunu değerlendirmek amacıyla uzun zamandır çeşitli anket ve ölçek çalışmaları yapılmaktadır. Bu anketlerde yer alan sorular genel olarak iştah, havlama, eliminasyon davranışı, gündüz/gece ritimleri, amaçsızca yapılan davranışlar, adapte olabilme yeteneği, sosyal davranışlar, algısal yetenek, oryantasyon bozukluğu, bellek ve kişilik değişikliklerini ölçmeyi hedefleyen çeşitli maddeler içermektedir (Azkona ve ark., 2009; Colle ve ark., 2000; Landsberg ve ark., 2012; Landsberg ve Malamed, 2017; Madari ve ark., 2015; Neilson ve ark., 2001; Osella ve ark., 2007; Ruehl ve ark., 1995; Salvin ve ark., 2011). Yapılan bu çalışmada DISHAA ve CCDRS olmak üzere iki farklı anket değerlendirmesi yapılmıştır. DISHAA anketinde hasta sahiplerine yöneltilen ana soru başlıklarından birisinin “aktivite” olması özellikle bu anket çalışmasını tercih etmemizde en önemli faktörlerden birisidir. Geriatrik hayvanlarda aktivitede azalış veya artış durumunun değerlendirilmesi ağrı ile ilişkili olabilecek davranışsal değişiklikleri anlamamıza yardımcı olmaktadır.

Landsberg ve arkadaşları, anket sonucunda bilişsel fonksiyon bozukluğu belirtileri mevcutsa, nesne seçim testi ve DNMP (Delayed Non-Matching to Position Task) gibi daha ileri doğrulayıcı testler yapılabileceğini; bilişsel fonksiyon bozukluğunun davranışsal bir belirtisi mevcut değilse, primer bir davranış problemi olma ihtimalinin ayrıntılı davranışsal değerlendirme ile yapılması gerektiğini vurgulamışlardır (Landsberg ve ark., 2012).

Köpeklerde bilişsel fonksiyon bozukluğu teşhis edilirken sıklıkla kullanılan farklı davranış testleri mevcuttur. Bu testlere örnek olarak DNMP, nesne seçim ve reversal öğrenme testleri ve dikkatte seçicilik testi verilebilir. DNMP, görsel uzamsal öğrenmenin ve kısa süreli görsel uzamsal çalışma belleğinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılmaktadır (Chan ve ark., 2002; Studzinski ve ark., 2006).

Studzinski ve ark. (2006) yaptıkları çalışma ile köpeklerin artan yaşla birlikte daha fazla hata yaptığını ve köpeklerde yaşlanmayla ilişkili hafif görsel-uzamsal yetersizlik şekillendiğini belirlemiştir. Köpeklerdeki bu gerilemenin bilişsel fonksiyon bozukluğu durumunda beyinde Aβ protein birikimi başlangıcından

yaklaşık 2 yıl önce gerçekleştirebileceğini tespit etmişlerdir. Sonuç olarak DNMP testinin köpeklerde bilişsel gerileme için erken bir belirteç olarak kullanılabileceğini önermişlerdir (Studzinski ve ark., 2006).

Bu çalışmada tercih edilen davranış testi olan nesne seçim testi köpeğin ödülü elde etmek için iki farklı nesneden birini seçmesini gerektirmektedir. Bu test, köpeklerin bellek fonksiyonunun genel olarak değerlendirilmesi için önerilmektedir (Milgram ve ark., 1994). Değişik yaş gruplarındaki köpeklerle gerçekleştirilmiş olan ve nesne seçim testi ile öğrenme performansı arasındaki ilişkinin değerlendirildiği bir çalışmada, basit nesne seçim testlerinde köpekler ilişkisel öğrenme stratejisi kullanabilecekleri için performanslarında yaşla birlikte değişiklik olmadığı gösterilmiştir. (Cotman ve ark., 2002). Başka bir çalışmada ise birbirine benzer nesneler seçilerek testin zorluk derecesi artırılmıştır ve bu durumda köpeklerde yaşa bağlı performans eksikliklerinin şiddetlendiği görülmüştür (Tapp ve ark., 2003). Her iki araştırmanın sonuçları göz önünde bulundurularak proje kapsamında testin zorluğunu arttırmak amacıyla birbirine benzer nesnelerin kullanılmasına karar verilmiştir.

Proje kapsamında davranış testlerinin optimizasyonu aşamasında DNMP ve nesne seçim testinin bir arada yapılmasının köpeklerde test süresini uzattığı tespit edilmiş ve bu süre artışının teste karşı motivasyon ve ilginin azalması ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmanın örneklem grubunun geriatric köpeklerden oluşması uzayan test süresine karşı hem fiziksel olarak hem de mental olarak köpeklerin adaptasyonunu zorlaştıran bir faktördür. Bir diğer önemli faktör ise yaşla birlikte köpeklerde ağrı kaynaklı davranışsal ve fiziksel problemlerin görülme ihtimalinin artmasıdır. Bu ön sonuçlar göz önünde bulundurularak kısa sürede daha kesin sonuçlara ulaşabilmek adına uygulanan test sayısının azaltılmasına ve tek bir bellek testinin kullanılmasına karar verilmiştir.

Diğer canlılarda olduğu gibi köpeklerde de yaşlandıkça yaşam kalitesi (QoL) doğal bir süreç olarak etkilenmektedir. Yaşam kalitesi öznel ve birçok farklı değişkeni içeriğinde barındırması sebebiyle tanımlaması oldukça güç bir kavramdır. Kendisini linguistik olarak ifade edebilen bir canlı olan insanlarda bile yaşam kalitesini tanımlamak ve değerlendirmek oldukça güçken evcil hayvanlarda bu kriteri doğru şekilde değerlendirmek ile ilgili önemli endişeler mevcuttur. Yapılan çalışmalar yaşam kalitesinin tutarlı bir tanımının olmadığını vurgulamakta (Raply, 2003) ve bunun nedenlerini sağlık, psikolojik durum, sosyal ilişkiler, çevresel etkiler ve dış etkiler gibi birçok faktörün canlının yaşam kalitesini etkilemesiyle açıklamaktadır (Spofford ve ark., 2013). Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nın tanımlamasına göre (The WHOQOL Group, 1995) QoL, başka bireylerin ilgili bireyi nasıl yorumladığına dair dış görüşten ziyade, canlının kendi hayatı hakkında nasıl hissettiğine dair kişisel, özel ve öznel bir deneyimdir. Veteriner hekimlik mesleğinde hayvanlar nasıl hissettiklerini doğrudan ifade edemedikleri için tüm QoL değerlendirme araçları “Gözlemci tarafından bildirilen sonuç ölçütleri (ORO)” olarak sınıflandırılmaktadır (McMillan, 2003). Evcil hayvanların yaşam kalitesini o hayvan için anlamlı kabul edilen kriterlere göre değerlendirmek veteriner hekimlerin ve sahibinin sorumluluğundadır (Fulmer ve ark., 2022; Shanan, 2011).

QoL ile ağrı birbirleri ile yakın ilişkili iki ayrı kavramdır. Yayınlanan bir çalışmada QoL değerlendirmesinde yer alan 27 maddeden yalnızca birisinin ağrıyı değerlendirdiği görülmektedir (Wojciechowska ve ark., 2005). Araştırmacılar ağrıyla ilgili yalnızca sınırlı sayıda parametrenin dahil edilmesinin QoL değerlendirmesi için yanıltıcı olabileceğini vurgulamaktadır (Fulmer ve ark., 2022). Ağrı tüm canlılar için QoL'ın önemli göstergelerinden bir tanesidir. WHO tarafından yapılan bir araştırma, kronik ağrısı olan kişilerin, ağrısı olmayanlara kıyasla depresyon, anksiyete ve çalışma gücü yaşıma ihtimalinin çok daha yüksek olduğunu göstermiştir (Gureje ve ark., 1998). Mevcut çalışmada köpeklerin genel refah ve mental/duygusal sağlık durumlarının değerlendirilmesi için çoklu bir yaklaşım benimsenmiştir. Bu kapsamda, QoL ölçeği, kronik ağrı ölçeği, CCD ölçeği ve CBARQ anketleri köpek sahiplerine yöneltilerek köpeklerin refah durumları doğru şekilde belirlenmeye çalışılmıştır.

Çalışma kapsamında senyör köpeklerdeki fekal mikrobiyota bileşiminin immun sistem, bilişsel fonksiyon ve kaygı üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla köpeklerdeki fekal mikrobiyota bileşimini belirlemek için 16S rRNA analizinden yararlanılmıştır. Fekal mikrobiyota analizini gerçekleştirmek için 16S rRNA analizi dışında bakteri kültürü, metagenomik analiz (genomik DNA'nın shotgun sekanslaması), floresan in situ hibridizasyon (FISH) gibi hem geleneksel hem de moleküler teknikler mevcuttur. Bağırsak mikrobiyotası filogenetik açıdan çok çeşitlidir ve bu ekosistemi karakterize etmek için kullanılan moleküler yöntemlerdeki ilerlemelere rağmen, mevcut tüm bakterileri tanımlamak hala oldukça zordur (Suchodolski, 2022).

Bağırsakta yaşayan bakterilerin büyük bir kısmı anaerob oldukları için büyüyüp çoğalmaları için özel bir ortama gereksinim duymaktadırlar. Bazı özel araştırma laboratuvarları numune içerisindeki bakterileri tanımlamak ve daha sonra büyüyüp çoğalmaları için kültür koşullarını optimize etmek için moleküler araçların kombinasyonu aracılığıyla bu mikroorganizmaları yetiştirebilmektedir (Lau ve ark., 2016). Yalnızca geleneksel bakteri kültürü yönteminin kullanılması izole edilebilen bakteri sayısının azlığı nedeniyle hatalı sonuç elde etmeye sebep olabilir. Yakın tarihte yapılan bir çalışmada sağlıklı ve kronik ishali olan köpeklerden toplanan dışkı numuneleri disbiyoz durumunu veya patojenik bakteri kültürünün değerlendirilmesi için kör şekilde üç veteriner referans kliniğine gönderildi. Üç laboratuvarın tümünden alınan sonuçlar sağlıklı ve kronik ishali olan köpekler arasında mikrobiyota açısından önemli farklılık göstermedi. Ayrıca laboratuvarlar disbiyoz profilini sağlıklı köpeklerde daha sık görüldüğünü ve Hemolitik *E. coli*'nin sağlıklı köpeklerde ishali köpeklere göre daha sık izole edildiğini bildirmiştir (Werner ve ark., 2020). *Faecalibacterium* gibi anti inflamatuvar peptid üreten bakteriler ve *C. hirononis* gibi safra asidi dönüştürücü bakteriler standart aerobik tekniklerle yetiştirilemez (AlShawaqfeh ve ark., 2017; Vazquez-Baeza ve ark., 2016). Bununla birlikte, bağırsak enfeksiyonlarıyla ilişkili olduğu bilinen birkaç kültür edilebilir organizmanın (örneğin, *Salmonella* spp.) antibiyotik duyarlılığını test etmek için bakteri kültürü önemini korumaktadır (Suchodolski, 2022).

Bakteri kültürü, gastrointestinal kanaldaki mikrobiyal çeşitliliği analiz etmede yetersiz olduğu için, artık moleküler analizler bağırsağın mikrobiyal ekolojisinin değerlendirilmesinde standart yaklaşım haline gelmiştir (Desai ve ark., 2009; Handl ve ark., 2011; Middelbos ve ark., 2010; Suchodolski ve ark., 2008; Suchodolski ve ark., 2009; Swanson ve ark., 2011). Moleküler analiz için ilk olarak intestinal örneklerden (dışkı, biyopsi örneği, lümen içeriği gibi) DNA veya RNA ekstrakte edilmektedir. Daha sonra filogenetik tanımlama veya moleküler parmak izi için, belirli bir gen, genler içindeki spesifik bölgeleri hedefleyen evrensel primerler (bakteriyel, fungal veya arkeal) kullanılarak amplifiye edilmektedir. Bakteriyel ve arkeal tanımlama için, en yaygın şekilde 16S ribozomal RNA (16S rRNA) geni kullanılmaktadır. Diğer hedef genler arasında 16S-23S ITS (internal transcribed spacer) bölgesi ve şaperonin (cpn60) geni yer almaktadır (Desai ve ark., 2009).

Yeni nesil sekanslama (NGS), 16S rRNA gen dizilemesini, DNA shotgun dizilemesini (metagenomik) ve metatranskriptomik tekniğini içermektedir (Suchodolski, 2022). Metatranskriptomik analizi intestinal organizmaların gen ifadesini değerlendirmek için kullanılsa da, analizin oldukça masraflı ve karmaşık olması nedeniyle günümüzde sıklıkla tercih edilen bir yöntem değildir (Shakya ve ark., 2019). Evcil hayvanlarda intestinal mikrobiyota değerlendiren hemen hemen tüm araştırmalar, 16S rRNA gen dizilimini kullanmaktadır ve derin DNA shotgun dizilemesi yalnızca birkaç çalışmada gerçekleştirilmiştir (Barry ve ark., 2012; Swanson ve ark., 2011; Tun ve ark., 2012; Young ve ark., 2016).

16S rRNA gen dizilemesi şu anda mikrobiyom çalışmalarında standart bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir ve mikrobiyal kompozisyon, bireysel bakteri gruplarının veya tüm topluluğun sağlıklı ve hasta hayvanlar arasında nasıl farklılık gösterdiği veya diyet veya terapötik müdahalelere nasıl yanıt verdiği hakkında derinlemesine bilgi sağlamaktadır. Bu yöntem, mikrobiyota bileşimindeki genel farklılıkları saptamak için kullanışlı olmakla birlikte bu değişikliklere tam olarak hangi bakteri türünün neden olduğunu saptamak için yeterince güvenilir değildir. Aynı zamanda yapılan çalışmalar arasında kullanılan yöntemlerde önemli farklılıklar mevcuttur. Dizileme platformları, bioinformatik veri hattı ve mevcut filogenetik

veritabanı, aynı laboratuvarında yapıldığında bile zaman içinde sürekli bir gelişim içerisindedir. Bu nedenle, aynı çalışma ve/veya yöntemler içindeki verileri karşılaştırmak yararlı ve uygundur, ancak sonuçlar, farklı yöntemler kullanılarak ve farklı dönemlerde gerçekleştirilen çalışmalarda dikkatli bir şekilde yorumlanmalıdır (Suchodolski, 2022).

Sekanslama çalışmalarında, bakteri taksonlarının bolluğu, toplam bakteri topluluğunun nispi oranı olarak ifade edilmekte ve daha sonra örneklem grupları istatistiksel olarak karşılaştırılmaktadır. Nispi oranı etkileyen faktörler arasında; DNA ekstraksiyon yöntemi ve 16S rRNA geninin hangi değişken bölgesinin hedefleneceğini ve hangi taksonun amplifiye edileceğini etkileyen primer seçimi bulunmaktadır (Teng ve ark., 2018). İntestinal mikrobiyota ile ilgili çoğu çalışma V4 değişken bölgesini hedeflemektedir, ancak köpekler ve kediler için hangisinin tercih edildiği belirlenmemiştir (McDonald ve ark., 2018). Sekanslama işleminin yapılacağı platformun seçimi, seçilen biyoinformatik veri hattı ve referans veri tabanı da bildirilen oranları etkilemektedir (Allali ve ark., 2017; Garcia-Mazcorro ve ark., 2020).

Sekanslama sonuçlarının analiz edilmesi noktasında da çalışmalar arasında farklılıklar mevcuttur. Çoğu çalışmada bakteri taksonlarının analizi tüm taksonomik seviyelerden ziyade filum veya familya gibi birkaç filogenetik seviyede rapor edilmektedir. Bu durum taksonomik soyların çok çeşitli olması nedeniyle bazı araştırmacılar tarafından yanıltıcı olarak nitelendirilmektedir (Lyu ve ark., 2020; Suchodolski, 2022). Mikrobiyom çalışmalarının bir başka limitasyonu, çoğu araştırmanın küçük örneklem gruplarıyla yapıyor olmasıdır. Bu durum gözlemlenen değişikliklerin büyüklüğünün ne olduğunu belirlemeyi ve geniş bir popülasyonundaki normal mikrobiyota veya hedeflenen hastalık fenotipi ile nasıl karşılaştırıldıklarını tahmin etmeyi zorlaştırmaktadır.

Firmicutes (temel olarak Clostridiales), Bacteroides ve Fusobacteria köpek ve kedilerin kolonunda ve dışkıında baskın bakteri filumlarını oluşturmaktadır (Handl ve ark., 2011; Middelbos ve ark., 2010; Suchodolski ve ark., 2008; Swanson ve ark., 2011; Ritchie ve ark., 2008; Ritchie ve ark., 2010). Ancak yapılan çalışmalar arasında, bu bakteri gruplarının gözlenen miktarı farklılık göstermektedir. Örneğin 16S rRNA dizilemesi kullanılarak yapılan farklı çalışmalar arasında Firmicutes yüzdeleri, %25 - 95 arasında değişmektedir (Handl ve ark., 2011; Middelbos ve ark., 2010). Bu geniş değer aralığının DNA ekstraksiyon yöntemlerindeki farklılıklardan ve farklı evrensel PCR primerlerinin seçiminden kaynaklanması olasıdır. 16S rRNA analizi için en iyi yaklaşımdan ziyade olası limitasyonları anlamak, tutarlı yöntemler geliştirmeye çalışmak ve tamamlayıcı tekniklerden (qPCR ve metabolomik analizler gibi) yararlanmanın yardımcı olabileceği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Suchodolski, 2011; Suchodolski, 2022).

Mevcut tez çalışması kapsamında, köpeklerin tamamının bilişsel, kaygı ve ağrı durumları anket ve gözlemsel testler aracılığı ile değerlendirilmiştir. Gruplar arasında davranış analizleri açısından anlamlı bir fark tespit edilmemiş olmakla birlikte köpeklerde yaşlanma ile ilişkili belirgin davranış değişiklikleri gözlemlenmiştir.

Araştırmada test edilen köpeklerde nesne seçim testi sırasında gözlemlenen belirgin kaygı davranışlarına karşın CBARQ analizlerinde kaygı skorlarının oldukça düşük çıkması birbirleri ile çelişiyor gibi görülmekle birlikte beklenen bir sonuçtur. Nitekim, strese verilen fizyolojik yanıtta yaşa bağlı şekillen değişiklikler yaşlı bireylerde kaygının deneyim ve davranışsal yanıtları üzerinde önemli etkilere neden olmaktadır (Kogan ve ark., 2000). Yaşlanma ile değişen stres tepkilerinde otonom sinir sisteminin (OSS) stresli uyarılara tepki vermeden sorumlu olan sempatik bölümünde (sempatik sinir sistemi, SSS) meydana gelen değişiklikler özellikle önemlidir. Başta noradrenalin ve adrenalin olmak üzere stres cevabını etkileyebilen çeşitli nörotransmitterlerin yaşla birlikte değiştiği bilinmektedir (McNeilly ve Anderson, 1997). Noradrenalin seviyelerinin ve tepkilerinin yaşla birlikte arttığı ve yaşlı yetişkinlerin çeşitli stresörlere karşı genç bireylere kıyasla daha fazla plazma katekolamin artışı gösterdikleri tespit edilmiştir (Sunderland ve ark., 1994). Dahası,

yaşlı yetişkinlerin stresör sona erdikten sonra normal davranışlara dönme sürelerinin gençlere göre daha uzun olduğu bildirilmiştir (McNeilly ve Anderson, 1997). Bu durum, çalışmada test edilmiş olan yaşlı köpeklerin test esnasında belirgin kaygı davranışları sergilemesine karşın hayvan sahiplerinin köpeklerinde neden kaygı artışı bildirmediğini açıklamaktadır. Belirgin bir stresör olmadığı sürece yaşlı köpeklerde kaygı ile ilişkili davranışların gözden kaçması muhtemeldir. Nitekim mevcut araştırmada kaygı ile ilgili CBARQ değerlendirmesinde tırnak kesme ve yıkama gibi uygulamalarda skorlardaki belirgin artış dikkati çekmektedir. Bu durum da köpek sahiplerinin köpeklerinin vücut dilini okumada zorluk yaşamaları nedeni ile aşamalı şekilde ilerleyen kaygı tepkilerini gözden kaçırabildiğini düşündürmektedir. Nitekim, köpek sahiplerinin stres ile ilişkili vücut dillerini okumada yetersiz oldukları önceki araştırmalarda gösterilmiştir (Demirbas ve ark., 2016; Demirtas ve ark., 2023).

Yaşlı köpeklerde artan kaygı davranışlarında göz önünde bulundurulması gereken diğer bir durum kronik ağrı ile ilgili süreçlerdir. Son yıllarda kronik ağrı ve kaygı arasındaki ilişkiyi araştıran araştırma sayısı oldukça artmıştır. Bu araştırmalar kronik ağrı süreçlerinin insanlarda kaygı bozuklukları, depresyon ve post travmatik stres bozukluğu geliştirme riskini arttırdığını ortaya koymaktadır. Dahası insanlarda kronik osteoartritis ağrısı da artan kaygı bozuklukları riski ile ilişkilendirilmiştir (Asmundson ve ark., 2008). Ağrı ve kaygı durumlarının her ikisi de fizyolojik uyarılma ile ilişkilidir. Bu uyarılmadan kaynaklanan bedensel değişiklikler, kaçma ve geri çekilme gibi koruyucu bir işleve hizmet etmekle birlikte bu sürecin uzun süre devam etmesi durumunda organizmada zararlı etkilere sebebiyet verebilmektedir (Asmundson ve Katz, 2009). Kronik ağrı ve anksiyete arasındaki ilişkide rol oynayan temel mekanizma kronik ağrı gibi fizyolojik işleve sahip olmayan orantısız uyarıcı durumunda somatosensorik/algı yollarının hassasiyet kazanarak belirgin psikolojik belirtilere yol açmasıdır (Bliss ve ark., 2016). ABD’de gerçekleştirilen bir çalışmada, 8 yaş ve üzerindeki köpeklerin %80’inde osteoartritis kaynaklı kronik ağrı olduğu bildirilmiştir (Rialland ve ark., 2021). Bu tez çalışmasına dahil olan köpeklerin tamamının kronik ağrı ile ilişkili skorları yüksek olarak değerlendirilmiş ve bu skorlar Rialland ve ark. (2021)’ının sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Dolayısıyla,

köpeklerin tamamında test sırasında sergilenen kaygı ile ilişkili davranışların kronik ağrı ile ilişkili olabileceği öne sürülebilmektedir. Köpeklerin kronik ağrı skorlarının yüksek çıkmasına karşın kaliteli yaşam skorlarının da yüksek olarak değerlendirilmesi stres davranışlarına benzer şekilde köpek sahiplerinin değerlendirmeleri ile ilişkili bir limitasyona işaret etmektedir. Nitekim, kronik ağrı skalaları hayvan sahiplerinin gözlemleyebileceği mobilite değişiklikleri ile ilişkili skorlamaları içermekle birlikte (Demirtas ve ark., 2016), kaliteli yaşam değerlendirme ölçeklerindeki ağrı skorlamaları şiddetli ve/veya akut ağrı ile ilişkilidir. Kronik ağrılı köpeklerin özellikle sosyal ilişkilerde ağrıyı maskeleyen özellikleri kaliteli yaşam skorlarını etkileyebilen önemli bir faktördür (Mich ve Hellyer, 2008).

Evcil hayvanlarda akut ve kronik ağrı skalaları (örneğin Helsinki Kronik Ağrı İndeksi, Colorado State Üniversitesi Akut Ağrı Skalası, Glasgow Akut Ağrı Skalası) mevcut olsa da temel olarak ağrı değerlendirmeleri gözleme dayanmaktadır (Reid ve ark., 2018). Kedilerde yaygın olarak kullanılan ve yüz ifadelerini ölçerek akut ağrı hakkında değerlendirme yapma imkanı sağlayan Feline Grimace Skalası olarak isimlendirilen güvenilir ve geçerli bir ağrı skalası mevcuttur. Grimace skalası kedilerde olduğu gibi rat, fare, tavşan, domuz ve atlar için de geliştirilmiştir. Duygusal durumun ifadesinde vücut dilini ve yüz ifadesini belirgin şekilde kullanan köpekler için ise henüz bu skalanın adapte edilmesine yönelik bir çalışma gerçekleştirilmemiştir. Köpeklerde QoL'nin değerlendirildiği çalışmalara Grimace skalası veya ağrıyı daha detaylı ve somut olarak yorumlamaya yardımcı olacak bir skalanın ilave edilmesi ile daha güvenilir sonuçların elde edilebileceği düşünülmektedir.

Nörotrofin ailesinin bir üyesi olan BDNF, nöronların farklılaşması, fonksiyonel sinapsların oluşumu, gelişim sırasında ve yetişkinlikte nöroplastisite gibi birçok süreci etkileyen bir faktördür (Greenberg ve ark., 2009; Lindsay, 1994; Lu ve ark., 2008). İnsanlar üzerinde yürütülen araştırmalar, bipolar bozukluk, manik ve depresif hastalarda plazma BDNF seviyelerinin düştüğünü göstermiştir (Cunha ve ark., 2006; Palomino ve ark., 2006). Yapılan çalışmalarda hipokampal BDNF mRNA

ve protein seviyelerinde bağırsak-beyin eksenini ile ilgili değişiklikler kaydedilmiştir ve mikrobiyota profilinde değişikliklere yol açtığı bilinen enfeksiyon modellerinde, hipokampal BDNF, mRNA veya protein ekspresyonunun azalması, anksiyete benzeri davranışların artmasıyla ilişkilendirilmiştir (Bercik ve ark., 2010; Bercik ve ark., 2011). Kan-beyin bariyerini geçebilen BDNF'nin serum ve plazmadaki seviyelerinin beyin omurilik sıvısındaki BDNF seviyeleri ile yüksek derecede ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (Pan ve ark., 1998; Pillai ve ark., 2010). Rodentlerde ve insanlarda yapılan çalışmalar, stres ve glukokortikoid maruziyetinin hipokampusta ve prefrontal kortekste BDNF ekspresyonunu azalttığını ve majör depresif bozukluğu (MDD) olan insanlarda yapılan postmortem çalışmalarda BDNF seviyelerinin azaldığını göstermiştir (Chen ve ark., 2001; Duman ve Duman, 2015; Kuma ve ark., 2004). İnsanlarda yapılan bir meta analize göre depresyon gibi psikiyatrik rahatsızlığı olan hastalarda periferik serum ve plazma BDNF düzeylerinin düşük olduğu belirlenmiştir (Molendijk ve ark., 2014). İnsanlarda azalan BDNF seviyelerinin artan kaygı seviyeleri ve Alzheimer gibi bozukluklarla ilişkili olabileceği de bildirilmiştir. Dahası BDNF, insanlarda major depresyon, bipolar bozukluk, şizofreni ve alzheimer gibi birçok psikiyatrik ve nörodejeneratif hastalıkları içeren beyin patolojileri ve tedavi etkinliği için potansiyel bir biyobelirteç olarak önerilmiştir. Nitekim, bu hastalıkların tedavi süreçlerinin kan BDNF seviyelerinde önemli değişikliklere neden olması da bu hipotezi destekler niteliktedir (Jha ve ark., 2016). Son yıllarda sürdürülen çalışmalar yaşlı bireylerde BDNF seviyelerinin yaşa bağlı gelişen nörodejeneratif hastalık riskleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte bilişsel, fiziksel ve sosyal olarak aktif olan yaşlı bireylerin nörodejeneratif hastalık geliştirme riskinin daha az olduğu (Stern, 2012) ve zenginleştirilmiş ortamda tutularak fiziksel aktivitelerde bulunan hayvanlarda BDNF seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (Marlatt ve ark., 2012; Nithianantharajah ve ark., 2006). Dolayısıyla yaşlı bireylerde düşük BDNF seviyelerinin sadece nörodejenartif süreçler ile değil bozulmuş refah durumu ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Bu araştırmada BDNF analizleri sonrasında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamış olmakla birlikte her iki grup ortalamasının da sağlıklı köpeklerde belirtilen BDNF seviyeleri ortalamasına göre oldukça düşük ve kaygılı köpeklerdeki BDNF ortalamasına yakın olduğu tespit edilmiştir (Moesta ve ark., 2020). Bu araştırmada köpeklerin tamamında tespit edilmiş olan düşük BDNF seviyelerinin birçok durumla ilişkilendirilmesi mümkündür. Yaşlanma süreci BDNF seviyelerini direkt etkileyebilecek bir faktör olmakla birlikte yakın zamanda yapılan bir çalışmada yaşlı köpeklerin BDNF seviyelerinde anlamlı bir düşmenin tespit edilmemiş olması köpeklerde fizyolojik yaşlanma sürecinin BDNF seviyelerinde azalmaya neden olmadığını göstermiştir (Isaka, 2022). Söz konusu araştırmada BDNF'nin serum konsantrasyonları açısından, dört grup arasında önemli farklılıklar bulunmamıştır. Bu sonuçlara göre, serum BDNF seviyeleri genç köpeklerde ($3,39 \pm 1,23$ ng/ml) ve yaşlılarda ($3,35 \pm 0,69$ ng/ml) olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla, mevcut araştırmadaki düşük BDNF seviyelerinin fizyolojik yaşlanma ile ilişkili olmadığı dşnlmştir.

Yaşlanan köpeklerde artan kaygı durumu, genel sağlık ve yaşam kaliteleri açısından önemli bir husustur. Bu duruma katkıda bulunan faktörlerin anlaşılması yaşlı köpeklerin yaşam kalitelerini arttırma ve onlara uygun bakım ve destek sağlama açısından önem arz etmektedir. Yaşlı köpekler üzerine yürütülmüş araştırmalarda, yaşlanan köpeklerde kaygı ile ilişkili davranışların artışına dair önemli bulgular sunulurak, bu sorunun potansiyel nedenlerinin ve mekanizmalarının anlaşılmasının önemi vurgulanmıştır (Chapagain ve ark., 2018; Landsberg ve ark., 2012). Yaşlı köpeklerdeki bilişsel düşüş anksiyete benzeri davranışların artışı ile ilişkilendirilmiş (Chapagain ve ark., 2018) olup; biliş ve kaygı arasındaki bu olası ilişki bu araştırma kapsamında gerçekleştirilen davranış değerlendirmelerinin sonuçları ile desteklenmiştir. Nitekim, bu araştırma kapsamında nesne seçim testlerinde gruplar arasında fark olmamakla birlikte köpeklerin eğitilebilirlik skorlarının düşük olduğu ve test sırasındaki performanslarının kaygı ve ağrı davranışları nedeni ile azaldığı gözlemlenmiştir.

Yaşlı köpeklerde BDNF seviyeleri ile kaygı arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi yaşlanma ile artan kaygı davranışlarının anlaşılması açısından önem taşımaktadır (Wetherel ve ark., 2002). Nitekim, BDNF ve kaygı arasındaki ilişkiye odaklanan çok sayıda çalışma, BDNF seviyelerinin anksiyete davranışlarıyla ilişkili olduğunu ve bu ilişkinin yaşlanmayla birlikte daha belirgin olabileceğini önermektedir (Zhu ve ark., 2019). Yaşlanmayla gerçekleşen BDNF ve kaygı arasındaki bu ilişkinin azalmış hipokampal hacme bağlı olabileceği düşünülmekle birlikte (Duman, 2017) köpeklerde bu ilişkinin ortaya konulması için fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme (fMRI) çalışmaları ile desteklenen davranış ve BDNF analizlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Mevcut araştırmada nesne seçim testi sırasındaki kaygı davranışları, CBARQ analiz sonuçları ile ilişkilendirilememiş olup bu durum birçok neden ile açıklanabilir. Bunlardan ilki, CBARQ analizinin köpeklerle ilgili genel duygusal yatkınlık durumlarının tespit edilmesinde kullanılan bir yöntem olmasıdır. Dolayısıyla yaşla birlikte artan kaygı süreçlerinin değerlendirilmesi ile ilgili herhangi bir alt parametre içermemektedir. Dahası, bu çalışmada köpeklerde tespit edilmiş olan yüksek ağrı skorları artan kaygıdaki en önemli etkenlerden birisinin kronik ağrı durumu olabileceğini göstermektedir (Asmundson ve Katz, 2009; Zhuo, 2016). Ağrı, BDNF seviyelerinde azalma ile ilişkilendirilmiş önemli bir etkindir ve bu araştırmadaki azalan BDNF seviyelerinin açıklanmasında ön plana çıkmaktadır. Nitekim, kronik ağrı maruziyeti yaşayan hayvanlarda azalmış BDNF seviyeleri daha önceki araştırmalarda gösterilmiştir (Nuseir ve ark., 2015) Bu sonuçlar, BDNF'nin yaşlı köpeklerde refah durumlarının belirlenmesi ve takibinde önemli bir biyobelirteç olabileceği hipotezini desteklemesi açısından önem arz etmektedir.

İmmun yaşlanma basitçe yaşlanmayla birlikte immün sistemde kademeli olarak şekillenen bozulma olarak tanımlanmaktadır (Day, 2010; Holder ve Mirczuk, 2018; Rosato ve Salsano, 2008). Bu süreç timüs involüsyonu ve timusta üretilen saf T hücrelerinin azalmasıyla yakından ilişkilidir. Köpeklerde yaşlanma ve immün sistem ilişkisini araştıran birçok çalışma periferik kandaki CD4⁺ T hücrelerinin azalması, CD8⁺ hücre kümesinin genişlemesi ve bunun sonucunda CD4:CD8

oranının azalması gibi bazı bulguları vurgulamaktadır (Blount ve ark., 2005; Greeley ve ark., 1996; Greeley ve ark., 2001; Heaton ve ark., 2002; HogenEsch ve ark., 2004; Pereira ve ark., 2019; Strasser ve ark., 2000; Withers ve ark., 2018). Yaşa bağlı değişiklikler arasında, lenfositlerin mitojenlere karşı proliferatif tepkisinin azalması ve hücre aracılı immun yanıtın bozulması yer alır. Ayrıca, Th hücrelerinin işlevselliğinin azalması ile ilgili olarak humoral immun yanıtta da düşüş söz konusu olmaktadır. Günümüzde temel aşılama protokolünün minimum bağışıklık süresi göz önüne alınarak üç yılda bir tekrarlanması genç ve yetişkin köpekler için yeterli koruma sağlasa da (Mouzin ve ark., 2004) senyör köpeklerde yeterli koruma sağlanıp sağlanmadığı konusunda soru işaretleri mevcuttur (Ellis ve ark., 2016). Bu tez çalışmasında en az üç yıl önce aşılanmış köpekler ve her yıl düzenli olarak aşılanmış senyör köpeklerin oluşturdukları immun yanıt düzeylerinin karşılaştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla güncel aşılama minimum koruma sürelerinin üç yıl olduğu göz önünde bulundurularak en az üç yıl önce aşılanmış olan ve düzenli aşılanan köpekleri içeren örneklem grupları oluşturulmuştur.

Yaşla birlikte enfeksiyon ve aşı gibi yeni antijenik uyarımlara karşı immun yanıt oluşumunda azalma şekillenmektedir ve bu durumun temel nedeninin periferik saf T hücre havuzundaki azalma ve T hücre reseptörlerinin repertuarındaki düşük çeşitlilik ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Holder ve Mirczuk, 2018). Seyahat için kuduza karşı ilk kez aşılanan kedi ve köpekler üzerinde yapılan bir çalışmada yaşlı köpeklerin antikor titrelerinde hızlı bir düşüş olduğu ve bunun aşılama başarısızlığında artışa neden olduğu görülmüştür. Bunun bir sonucu olarak da yaşlı hayvanların yasal olarak gerekli olan antikor titresine ulaşmakta başarısız olduğu gösterilmiştir (Day ve ark., 2016; Kennedy ve ark., 2007). Köpeklerde yapılan bir çalışmada Th1 ve Th2 alt popülasyonlarının nispi yüzdelerinin ve periferik kandaki Th1:Th2 oranının büyümeyle birlikte arttığı görülmüştür. Özellikle Th1 alt popülasyonunun yüzdeleri büyüme ile birlikte dikkate değer bir artış göstermiştir ve Th1 alt popülasyonunun nispi yüzdeleri ile yaşlanma arasındaki korelasyon katsayısı yüksek bulunmuştur (Horiuchi ve ark., 2007). Bu araştırmada yaşamı boyunca her yıl düzenli olarak aşılanan ve aşılama yolu ile kronik immun sistem stimülasyonuna maruz kalan köpeklerde proinflamatuvar sitokin seviyelerinde artışa işaret edebileceği

düşünülen Th1 düzeyinde artış ve en az üç yıl önce aşılanan köpeklerin oluşturduğu grupta Th1 seviyelerinin düzenli aşılanan gruba göre daha düşük olması beklenmesine karşın iki örneklem grubu arasında Th1/Th2 oranında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu çalışma sonucuna göre yıllık olarak uygulanan aşılama protokolünün immun sistemin hazırlanması süreci üzerinde bir etkisi olmadığı görülmüştür. Ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamakla birlikte en az üç yıl önce aşılanan örneklem grubunun Th1/Th2 oranı ortalama % 2,70, her yıl düzenli olarak aşılanan grubun Th1/Th2 oranı ortalama %4,27 olarak bulunmuştur. Düzenli aşılanan grupta Th1/Th2 oranının görece daha yüksek olmasının yıllık aşılamının proinflatuar-antiinflatuar sitokinler arasındaki dengede şekillenen değişikliğin proinflatuar sitokin yönünde artıştan kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgular ışığında yıllık aşılamının immun yanıt üzerine etkisini anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu düşünülmektedir.

Tıp ve veteriner hekimliği alanında kullanılan aşılar aşı etkinliğini artırmak amacıyla adjuvan maddeler kullanılmaktadır. Adjuvan aracılı immun yanıtta şekillenen artan etkinlik, hem doğal hem de adaptif immun yanıt mekanizmaları aracılığıyla gerçekleştirilmektedir (Eisenbarth ve ark., 2008; Exley ve ark., 2010). İnsanlarda aşılarda olumsuz etkilerini araştıran çalışmalar özellikle adjuvan olarak alüminyum içeren aşılarda aşılarda yoğunlaşmaktadır. Bu çalışmalar yaşam boyunca şekillenen immun yanıt aktivitesi, nörotoksik metallere, pestisitlere/ herbisitlere/ fungusitlere maruziyet gibi faktörlerin mikrogliya aktivasyonuna neden olarak hipotalamus, temporal lob (hipokampus, striatal alan, amigdala ve entorinal korteks) ve prefrontal korteks gibi CNS'in en savunmasız kısımlarında progresif nöron kaybına yol açabildiğini vurgulamaktadır (Blaylock, 2013). Aşı ve nöroinflamasyon arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar bütün aşılarda için enjeksiyon sonrası eksprese edilen periferik proinflatuar sitokinlerin (IL-1 β , IL-6 ve TNF- α) beyine ulaşarak mikrogliya aktivasyonuna ve daha sonra nöroinflamasyona neden olabileceğini ileri sürmektedir (Giannotta ve Giannotta, 2018). Alüminyumun genotoksik, prooksidan, proinflatuar ve immünotoksik (Blaylock 2012; Lujan ve ark., 2013; Tomljenovic, 2011; Tomljenovic ve Shaw, 2011a; Tomljenovic ve Shaw, 2011b) olması nedeniyle alüminyum nörotoksitesisi tipik olarak öğrenme, bellek, konsantrasyon ve

psikomotor kontrolde bozulma, artan nöbet aktivitesi ve değişen davranış paternleri (kafa karışıklığı, kaygı, tekrarlayan davranışlar ve uyku bozuklukları (Tomljenovic, 2011)) şeklinde kendini göstermektedir. Alüminyum nörotoksitesinde şekillenen CNS işlevlerindeki değişiklikler aynı zamanda otizm spektrum bozukluğu için de tipik bulgular olarak kabul edilmektedir (Tomljenovic ve ark., 2014). Bebek ve çocukların, aşılama programları aracılığıyla rutin olarak adjuvan formu olarak alüminyuma maruz kalmaları bu durumun özellikle otizm spektrumunun nörogelişimsel ve immün sendromlarına kısmen de olsa neden olabileceğine dair artan endişelere neden olmaktadır (Melendez ve ark., 2013; Seneff ve ark., 2012). Özellikle TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler, otizm spektrum bozukluğu olan çocukların sitokin profilinde tanımlanmıştır (Giannotta ve Giannotta, 2018). Yapılan bir çalışmada, otizm spektrum bozukluğu durumunda beyin dokusunda alüminyum varlığı gösterilmiştir ve mikrogliya hücrelerinde alüminyuma rastlanmıştır (Mold ve ark., 2018). Tarihsel olarak alüminyum adjuvanları güvenli olarak gösterilmiş olsa da (Offit ve Jew, 2003), hayvan modelleri ve insanlar üzerinde yapılan çalışmalar, bu maddelerin immüno-inflamatuvar durumlara neden olma potansiyellerini göstermiştir (Authier ve ark., 2001; Couette ve ark., 2009; Gherardi ve Authier, 2012; İsrail ve ark., 2009; Lujan ve ark., 2013; Petrik ve ark., 2007; Shaw ve Petrik, 2009). İmmün sistemin uzun süreli hiperaktivasyonu ve tekrarlanan maruziyetle birlikte tetiklenen kronik inflamasyonun, alüminyum adjuvanlarının toksisitesinin altında yatan iki ana faktör olduğu düşünülmektedir (Tomljenovic ve ark., 2014). Alüminyumun özellikle endokrin ve immün sistemin regülatör yollarına olan etkisi, beyin gelişimi ve işlevi üzerinde zararlı etkileri olan proinflamatuvar ve prooksidatif kaskadları tetikleyebilmektedir (Blaylock, 2012; Lujan ve ark., 2013; Tomljenovic ve Shaw, 2011b). Bu nedenle, birbirine yakın tarihte yapılan ve tekrar edilen pediatrik aşılarda otizm spektrum bozukluğu gibi hastalıkların oluşumuna katkıda bulunabileceğine dair endişeler mevcuttur (Blaylock, 2012; Seneff ve ark., 2012; Tomljenovic ve Shaw, 2011b). Yapılan hayvan deneyleri de alüminyum nanopartiküllerinin adjuvan olarak kullanımı sonucunda kan-beyin ve kan-beyin omurilik sıvısı bariyerini geçerek nöral dokularda zararlı immüno-inflamatuvar yanıtları tetikleme kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir (Khan ve ark., 2013; Lujan ve ark., 2013). Alüminyum adjuvanları, immün aktivasyon ve inflamasyonda rol oynayan 312 geni aktive

etmektedir (Mosca ve ark., 2008). Alüminyum adjuvan enjeksiyonundan sonraki 4 saat içinde proinflatuar IL-1b ve IL-6 dahil olmak üzere en az 13 sitokin ve kemokin üretilmektedir (McKee ve ark., 2009). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada genç erkek farelere 2 hafta arayla iki deri altı alüminyum adjuvan enjeksiyonu yapılmıştır. Bunun sonucu olarak enjeksiyondan sonra 6 ay kadar devam eden mikrogliya ve astrosit aktivasyonu şekillendiğini ve ayrıca, farelerde alüminyum tarafından indüklenen mikrogliozis ve astrogliozis, motor nöron ölümü, bilişsel eksiklikler, öğrenme ve motor görevlerde performans düşüşü olduğunu gözlemlemişlerdir (Petrik ve ark., 2007; Shaw ve Petrik, 2009). Bu araştırmada veteriner hekimlik alanında kuduz aşısı için kullanılan adjuvanların insanlarda ve deney hayvanlarında yapılan çalışmalara benzer şekilde immun-nöroendokrin yollar aracılığı ile bilişsel fonksiyonları etkileyebileceği hipotezi ile gruplar arasında bilişsel fonksiyon açısından olası farklılıklar değerlendirilmiştir.

Aynı zamanda insanlarda yapılan çalışmalardan yola çıkarak Th1 hücre ve Th2 hücre sitokinleri veya pro-inflatuar ve anti-inflatuar sitokinler arasındaki dengesizliğin, psikiyatrik bozuklukların oluşmasında rol oynadığı düşünülmektedir (Anisman ve Merali, 2003; Dubas-Slemp ve ark., 2003; Guerenö ve Diez, 2002; Kim ve Maez, 2003). İnsanlarda yürütölen çalışmalarda şizofreni hastalarında daha yüksek Th1/Th2 oranı bulunmuştur (Cazzullo ve ark., 1998; Cazzullo ve ark., 2001; Ganguli ve ark., 1989; Ganguli ve ark., 1992; Kim ve ark., 2000; Kim ve ark., 2004). Yürütölen bir başka çalışmada depresif hastaların %50'sinde daha yüksek pro-inflatuar sitokin aktivitesi gözlenmiştir (Myint ve ark., 2005). Buna ilaveten antidepresanların, anti-inflatuar etki gösteren bir sitokin olan IL-10'daki bir artış nedeniyle IFN- γ / IL-10 oranını azaltabildiği gözlenmiştir (Kubera ve ark., 2001a; Kubera ve ark., 2001b).

Mevcut araştırmada köpek grupları arasında Th1/Th2 ve bilişsel fonksiyon açısından anlamlı bir fark bulunmaması rutin aşılamanın köpeklerin bağışıklık ve sinir sistemleri üzerine olumsuz bir etkisinin olmadığını düşündürmektedir. Bununla birlikte bu konuda kesin bir yargıya varılabilmesi için konunun daha geniş bir örneklem grubu ile araştırılması gerekmektedir. Dahası köpeklerde Th1/Th2

oranından ziyade daha çok CD4/CD8 oranının araştırılması ve Th1/Th2 açısından değerlendirme yapan sınırlı sayıda literatürün bulunması nedeniyle yaşlı köpeklerde kabul görmüş referans Th1 ve Th2 değerlerinin olmayışı bu analizin değerlendirilmesinin önemli limitasyonlarından bir tanesidir.

Son yıllarda, yeni nesil sekanslama teknolojileri kullanılarak 16S rRNA sekanslama analizi, mikrobiyota bileşiminin yüksek doğruluk ve verimlilikle incelenmesini sağlamıştır. Bununla birlikte köpeklerde 16S rRNA genetik sekanslama analizi kullanılarak intestinal mikrobiyom bileşimi ile yaşlanma arasındaki ilişki hakkında sınırlı sayıda bilgi mevcuttur (Omatsu ve ark., 2018). Bu araştırmada ilk defa yaşlı köpeklerde bağırsak mikrobiyotası ve davranış arasındaki ilişki incelenmiştir.

Güncel literatürlerde “Bağırsak-Mikrobiyota-Beyin Aksisi” olarak da isimlendirilen bağırsak-beyin eksen, temel olarak merkezi sinir sistemi (MSS), enterik sinir sistemi ve bağırsak mikrobiyotası gibi çoklu biyolojik sistemleri içeren intestinal bakteriler ile beyin arasında çift yönlü iletişime izin veren bağlantı ağı olarak tanımlanmaktadır (Grenham ve ark., 2011; Rhee ve ark., 2009; Cryan ve ark., 2019; Martin ve ark., 2018). Bağırsak mikrobiyotası, hayvanlarda hem "doğrudan" hem de "dolaylı" sinyaller aracılığıyla sinir sistemiyle kimyasal iletişim yolu ile homeostaz ve davranışların modülasyonuna yardımcı olmaktadır (Morais ve ark., 2021). Dolaylı sinyaller, nöroendokrin sistemin mikrobiyal regülasyonda rol oynaması ile ilişkili olarak gerçekleşmektedir (Sudo ve ark., 2004). Örneğin glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) iştah ve beslenme davranışında görev almaktadır (Aresti Sanz ve El Aidy, 2019). Doğrudan sinyallere örnek olarak, kısa zincirli yağ asitleri verilebilir. Diyetteki liflerin fermentasyonu yolu ile üretilen kısa zincirli yağ asitleri; nöroplastisite, epigenetik, gen ekspresyonu ve bağışıklık sistemi regülasyonunda rol oynayarak merkezi sinir sistemi üzerinde etkili olmaktadır (Morais ve ark., 2021). Yapılan çalışmalarla kısa zincirli yağ asitlerinin çeşitli davranışlar ve hastalıklarda rol oynadığı bilinmektedir (Dalile ve ark., 2019). Örneğin farelerde yapılan bir çalışmada bellek, sinaptik plastisite, depresyon ve kaygı gibi birçok psikolojik ve öğrenme ile ilgili süreçlerde rol oynadığı bilinen BDNF

ekspresyonunun, kısa zincirli yağ asidi olan sodyum bütiratın akut eksojen uygulaması ile değiştirildiği ifade edilmektedir. Aynı çalışmada, 28 gün boyunca sodyum bütirat uygulamasının, farelerde depresif benzeri davranışlarda önemli bir azalmaya yol açtığı görülmüştür (Schroeder ve ark., 2007). Zebra balıkları ile yapılan bir başka çalışmada *Lactobacillus rhamnosus* uygulamasının, zebra balığında BDNF ekspresyon seviyelerini olumlu bir şekilde değiştirdiği gözlenmiştir (Borrelli ve ark., 2016). Bağırsak mikrobiyotası, sinir sistemi tarafından kullanılan nörotransmitterlerin konsantrasyonlarını modüle etmektedir ve ayrıca intestinal mikroorganizmalar, nörotransmitterleri hem kendileri sentezleme yeteneğine sahiptirler hem de canlı tarafından nörotransmitter üretimini indükleyebilirler (Barrett ve ark., 2012; Morais ve ark., 2021; Strandwitz ve ark., 2019; Yano ve ark., 2015). Örneğin *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Parabacteroides* ve *Escherichia* spp.'nin gama aminobütirik asit (GABA) ürettiği bilinmektedir (Strandwitz ve ark., 2019). Bakteriler aynı zamanda serotonin (5-hidroksitriptamin (5-HT)) üretiminde de önemli rol oynamaktadır (Clarke ve ark., 2013). Enteroendokrin hücreler (EEC'ler) tarafından 5-HT üretimi, indol, kısa zincirli yağ asidi, sekonder safra asitleri, a-tokoferol, p-aminobenzoat ve tiramin dahil olmak üzere çeşitli mikrobiyal metabolitlerden etkilenmektedir (Yano ve ark., 2015; Morris ve ark., 2017). GF fareler ve antibiyotikle tedavi edilen fareler, yapılan çalışmalarda azalan 5-HT biyosentezi göstermişlerdir. 5-HT'nin çoğu bağırsakta üretilmekte ve kan-beyin bariyerini geçemediği için enterik seviyeler beyindeki 5-HT seviyelerini doğrudan etkileyememektedir (Yano ve ark., 2015). Bağırsak mikrobiyotası ile beyindeki 5-HT üretimi arasındaki mekanik bağlantı henüz netleştirilemese de GF farelerin hipokampusunda de 5-HT ve metabolik öncüsü olan triptofanın konsantrasyonlarının azaldığı görülmüştür (Clarke ve ark., 2013; Yano ve ark., 2015). Bağırsak mikrobiyotası ve beyin ayrıca dolaşımdaki sitokinler aracılığıyla sistemik immun sistem ile de etkileşim içerisinde (Hsiao ve ark., 2013a). Sistemik immünitede şekillenen değişiklikler depresyon, anksiyete gibi birçok nöropsikiyatrik hastalıkta periferik inflamasyonun artışı ile kendini göstermektedir (Yuan ve ark., 2019). Depresyon semptomu gösteren kişilerde sıklıkla IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ ve C-reaktif protein gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonu artmaktadır (Howren ve ark., 2009; Owen ve ark., 2001; Maes ve ark., 1994). Bağırsak mikrobiyotasının, özellikle kısa zincirli yağ asitlerinin

proinflamatuvar sitokin üretimini azaltarak bu sitokinlerin transkripsiyonunu etkilediği bilinmektedir (van den Elsen ve ark., 2017). Sitokinler ve kemokinler beyinde yerleşik immun hücreler tarafından üretilebildiği gibi kan beyin bariyerinden doğrudan geçerek merkezi sinir sistemine erişebilmektedir (Morais ve ark., 2021). Bağırsak mikrobiyotası aynı zamanda enterositler arasındaki sıkı bağlantı bütünlüğünü desteklemektedir. Bu nedenle, disbiyoz ve buna bağlı bağırsak geçirgenliğinde şekillenen artış insanlarda romatoid artrit, Alzheimer hastalığı, astım, otizm spektrum bozukluğu gibi hastalıklarda tanımlanmıştır (Appleton, 2018). Yapılan çalışmalarda kan beyin bariyerinin de bağırsak mikrobiyotasından etkilendiğini, GF farelerinde okludin ve klaudin gibi sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunun azalması nedeniyle, kontrol farelerine göre kan beyin bariyerinde geçirgenliğin daha fazla olduğu gösterilmektedir (Braniste ve ark., 2014). Bağırsak mikrobiyotasının anksiyete ile ilişkili davranışlar ile bağlantısı deney hayvanları ile yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Clarke ve ark., 2013; Heijtz ve ark., 2011; Neufeld ve ark., 2011; Sudo ve ark., 2004). Sudo ve ark. (2004)'nın yaptığı çalışmada stres yanıtı olarak HPA aksisinin anormal işlevi sonucu GF farelerin, spesifik patojen içermeyen (SPF) farelere göre daha yüksek adrenokortikotropik hormon (ACTH) ve kortikosteron seviyelerine sahip olduğu gösterilmiştir. GF farelerde stres yanıtı, SPF farelerinden alınan dışkı numunesinin kolonizasyonu yoluyla kısmen tersine çevrilmiştir. Ayrıca, yürütülen farklı çalışmalarda da probiyotik takviyesinin, anksiyete ve stres ile ilişkili yanıtların modülasyonunda pozitif etki gösterdiğini bulmuşlardır. Bu çalışmalarda *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1) ve *Bacteroides fragilis* (NCTC 9343) uygulamasının kaygı benzeri davranışları azalttığı gözlemlenmiştir (Bravo ve ark., 2011; Hsiao ve ark., 2013b).

Yürütülen tez çalışmasında tüm bu bilgiler ışığında senyör köpeklerde fekal mikrobiyota ve uçucu yağ asidi analizi profilinin incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca yıllık aşılanmanın fekal mikrobiyota ve uçucu yağ asidi üzerine etkisi olup olmadığı incelenerek fekal mikrobiyota profili ile bilişsel fonksiyon arasındaki ilişki anlaşılmaya çalışılmıştır. İnsanlarda ve deney hayvanlarında bu alanda yürütülen çalışmaların sayısının oldukça fazla olması, beşeri tıpta nörodejeneratif hastalıkların mekanizmalarının anlaşılmasında büyük bir rol oynamaktadır. Ancak evcil

hayvanlarda bağırsak-mikrobiyota-beyin aksisi ile stresle ilişkili davranış problemleri ve bilişsel fonksiyon bozukluğu arasındaki ilişkiyi anlamaya yönelik yürütülmüş çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Bu fizyolojik mekanizmaların anlaşılabilmesi için daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç duyulduğu düşünülmektedir.

Güncel araştırmalar, özellikle yaşlı köpeklerde bağırsak-beyin ekseninin davranış değişiklikleri ve nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkilerinin ortaya konulmasının önemini vurgulamaktadır (Ambrosini ve ark., 2019). İntestinal mikrobiyom bileşiminin yaşlanma ve bellek ile olan ilişkisini inceleyen bir çalışmada en fazla bulunan bakteri filaları Bacteroidetes ve Firmicutes'tir (her ikisi de %33), ardından Fusobacteria (%24), Proteobacteria (%7) ve Actinobacteria (%2) gelmektedir. Bu çalışmada Fusobacteria'da daha önce literatürde tanımlanmayan, yaşla birlikte önemli bir düşüş gözlemlenmiştir (Kubinyi ve ark., 2020). İnsanlarda yapılan bir başka çalışmada da yüz yaşını aşmış insanlarda, genç erişkin ve yaşlı insanlara kıyasla Fusobacteria prevalansının arttığı bulunmuştur (Biagi ve ark., 2010). İnsanlarda yapılan çalışmalarda yaşlı insanların, genç insanlara kıyasla daha düşük mikrobiyal çeşitliliğe, daha yüksek Bacteroidetes miktarına ve daha düşük *Bifidobacterium*, Firmicutes ve *Clostridium* kümesi IV miktarına sahip olduğu gösterilmiştir (Kumar ve ark. 2016; Saraswati ve Sitaraman 2014). Yaşlı insanlarda mikrobiyota kompozisyonundaki değişikliği inceleyen çalışmalarda yetersiz beslenme, azalmış bağırsak motilitesi ve polifarmasi nedeniyle artan *Enterobacterium* ve *Bacteroides* ve azalan *Bifidobacterium*'u içeren mikrobiyom profili ortaya konulmuştur (Kumar ve ark., 2016).

Farklı yaş gruplarına (0,5-1, 2-5 ve 6-10 yaş grubu) ait 96 adet sağlıklı köpek ile yapılan ve köpeklerin mikrobiyota profilini inceleyen çalışmada alfa ve beta çeşitliliğinde yaşa bağlı farklılık ve birkaç bakteri grubunda farklı miktarlarda artış olduğu gösterilmiştir. Spesifik olarak, *Fusobacterium perfoetens*, yaşlı grubu oluşturan köpeklerde daha fazla miktarda bulunmuş ve köpeklerde yaşla birlikte en önemli ölçüde etkilenen tür olarak tanımlanmıştır . Bununla birlikte söz konusu çalışmada mikrobiyal çeşitliliğin yaşla birlikte azaldığı yönündeki görüş desteklenmemiştir (You ve Kim, 2021). Köpekler üzerinde yapılan başka çalışma ise

benzer şekilde ana bakteri filumlarının Firmicutes, Fusobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria ve Actinobacteria olduğunu göstermiş ve bağırsak mikrobiyotasının büyük popülasyonunun yaşlanmayla değişmediğini ancak küçük bir popülasyonda çeşitliliğin azalma eğiliminde olduğunu belirtmiştir (Mizukami ve ark., 2019). Çalışmalar arasındaki bu farklılıklar farklı çalışma kurguları ve örneklem gruplarından kaynaklanıyor olabilmekle birlikte köpeklerde yaşlanma ve cinsiyetin mikrobiyota üzerindeki etkisini daha net anlayabilmek için geniş ölçekli analizlerin yapılması gerekliliği literatürde vurgulanmaktadır (Omatsu ve ark., 2018).

Bu tez çalışmasında mikrobiyota analizi sonucunda her iki örneklem grubunda da beş ana bakteri filumu (%47,16) Firmicutes, (%35,6) Bacteroidetes, (%11,26) Fusobacteria, (%2,99) Proteobacteria ve (%2,14) Actinobacteria olarak bulunmuştur. Bu bakterilere ait yüzdelerin diğer çalışmalara göre farklı olmasının ırk, beslenme, hastalık geçmişi, çevre faktörlerinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Mevcut araştırmada Kubinyi ve ark. (2020)'nin yapmış oldukları çalışma ile uyumlu olarak Fusobacteria filumunda önemli bir düşüş olduğu fark edilmiştir. Çeşitli araştırmalar köpeklerde daha yüksek Fusobacteria oranının sağlıklı mikrobiyota (Mongillo ve ark., 2013; Pilla ve Suchodolski, 2020; Vázquez-Baeza ve ark., 2016) ile ilişkilendirirken, insanlarda artan Fusobacterium oranı inflamatuvar bağırsak hastalığı, kolorektal kanser ve akut apandisit gibi disbiyoz ile bağlantılı durumlar ile ilişkilendirilmiştir (Gevers ve ark., 2014; Swidsinski ve ark., 2011). Kirchoff ve ark. (2019) spesifik olarak agresif tutum sergileyen köpekler üzerinde çalışmış ve bağırsak mikrobiyotasının bileşiminin agresif ve agresif olmayan köpekler arasında farklılık gösterdiğini bildirmiştir. Araştırmalarında Proteobacteria ve Fusobacteria'nın, agresif olmayan hayvanlardan alınan numunelerde relatif olarak daha fazla olmasına karşın agresif köpeklerden alınan numunelerde Firmicutes'in daha fazla olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde başka bir araştırmada Fusobacteria, agresif olmayan köpeklerden alınan örneklerde daha fazla bulunurken, *Lactobacillaceae* ailesi ve daha spesifik olarak *Lactobacillus*'un, agresif köpeklerden alınan örneklerde daha fazla miktarda bulunduğu bildirilmiştir (Hernandez ve ark., 2022).

Bu çalışmada köpeklerin nesne seçim testi performansı ile Actinobacteria ve Coriobacteria popülasyonu arasında anlamlı bir ilişki olduğu bulunmuş ve Actinobacteria ve Coriobacteria popülasyonundaki artışın bellek testi performansındaki azalma ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular bellek testinde daha çok hata yapan ve düşük performans sergileyen köpeklerin dışkı numunesinde relatif olarak daha fazla Actinobacteria'nın bulunduğunu gösteren ve Kubinyi ve ark. (2020) tarafından yürütülmüş araştırmanın sonuçları ile paralellik taşımaktadır. İnsanlarda Alzheimer hastaları üzerinde yürütülmüş bir çalışmada gastrointestinal sistemde fazla miktarda Actinobacteria bulunduğu bildirilmiştir (Emery ve ark., 2017). Bu bulgu ve araştırmadaki veriler ışığında Actinobacteria'nın köpeklerde bellek ve bilişsel fonksiyonun değerlendirilmesinde bir belirteç olarak kullanılabileceği öne sürülebilmektedir.

Ekzokrin pankreas yetmezliği olan köpeklerdeki mikrobiyota profilinin incelendiği bir çalışmada 18 sağlıklı köpek kontrol grubu olarak kullanılmış ve sağlıklı köpeklerde Clostridia sınıfının bir üyesi olan *Lachnospiraceae* familyasının ortalaması %37,8 olarak belirtilmiştir (Isaiah ve ark., 2017). Bu tez çalışmasında ise 17 köpeğin *Lachnospiraceae* ortalamasının %3,75 olduğu tespit edilmiş ve bu oranın sağlıklı köpeklerde bildirilen ortalama değerin oldukça altında olduğu dikkati çekmiştir. İnsanlarda Alzheimer hastalarında *Lachnospiraceae* familyasında azalma olduğu (Zhuang ve ark., 2018) göz önünde bulundurulduğunda köpeklerde de bu azalmanın bilişsel gerileme ile ilişkili olabileceği düşüncesi doğmaktadır. Bununla birlikte mevcut tez çalışmasında köpeklerin hiçbirinde bilişsel fonksiyon bozukluğu teşhis edilmediği için *Lachnospiraceae* familyasının azalma nedeninin fizyolojik yaşlanma ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Yaşlanma ve bilişsel fonksiyon bozukluğu ile *Lachnospiraceae* familyası arasındaki ilişkiyi anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Aynı zamanda *Lachnospiraceae* familyasının başlıca fermentasyon son ürününün bütirat olması ve bütiratın bağırsak epitel hücrelerinin enerji kaynağı olarak rol oynaması bu familyanın önemini gösteren özelliklerdir. Bütiratın metabolik, trofik ve immun sistem üzerine olumlu etkileri göz önünde bulundurulduğunda yaşlanma etkisiyle *Lachnospiraceae* familyasında şekillenen düşüşün tüm bu olumlu etkilerde de bir gerilemeye sebep olabileceği

varsayılabilmektedir. *Lachnospiracea* familyası, bütirat miktarı ve yaşlanma ilişkisini anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Canlıların bebeklik döneminde *Bifidobacteria*'lar, memelilerin bağırsak mikrobiyotasının oldukça yaygın bulunan üyelerini temsil etmektedirler (Devika ve Raman, 2019). Yetişkinlik döneminde, seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı, ancak nispeten sabit kaldığı; yaşlılıkta ise tekrar azalma eğiliminde olduğu belirtilmektedir (Odamaki ve ark., 2016). Yaşlı popülasyonda antibiyotiklerin uzun süreli kullanımının bağırsak mikrobiyota bileşimi üzerinde büyük etkisi olduğu ve *Bifidobacteria* popülasyonunu azalttığı (Woodmansey ve diğerleri, 2004; O'Sullivan ve diğerleri, 2013) düşünülmektedir. Bunun sonucu olarak da antibiyotik tedavisinden sonra bağırsak mikrobiyotasındaki değişikliği düzenlemek amacı ile probiyotiklerin kullanımını vurgulayan yaklaşımlar bulunmaktadır (Rondanelli ve ark., 2015). İnsanlarda *Bifidobacterium*'un belirli suşlarının güvenilir olduğu yapılan çalışmalarla desteklenmiştir ve probiyotik olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Arbolea ve ark., 2016; O'Callaghan ve van Sinderen, 2016). Ayrıca insanlarda *Bifidobacteria*'nın depresyon ve anksiyete gibi psikolojik problemlerin semptomunu geriletmediği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Han ve ark., 2020; Tian ve ark., 2022). Ancak bunun altında yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu durumun patojenik mikroorganizmaların sayısının azalması, antiinflamatuvar etki, triptofan seviyelerinin regülasyonu, 5-HT sentezinin etkilenmesi, HPA aksisinin düzenlenmesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Li ve ark., 2023). Maternal seperasyon sonucu depresif semptomlar gösteren ratlarda *Bifidobacterium infantis*'in probiyotik olarak kullanılmasının triptofan düzeyini artırarak depresif benzeri fenotipi tersine çevirdiği gösterilmiştir (Desbonnet ve ark., 2010). Farklı memelilerin bağırsak mikrobiyota analizleri genellikle insan gastrointestinal sisteminde saptanan bazı *Bifidobacteria*'ların diğer birçok hayvanda da tanımlandığını göstermektedir (Lamendella ve ark., 2008). Bununla birlikte köpeklerde *Bifidobacterium*'un 1-7 haftalık yaş döneminde gözlendiğini, yaşlanmayla birlikte tespit edilmediğini ve yavrluk dönemine özgü bir bakteri olduğunu belirten çalışmalar da mevcuttur (Garrigues ve ark., 2022; Masuoka ve ark., 2017). Kedi ve köpeklerin bağırsak mikrobiyotasında *Bifidobacteria* popülasyonunu araştıran bir çalışma köpeklerde

Bifidobacterium'un ortalama görece bolluğunun %0,20 olduğunu ve *Bifidobacterium pseudolongum*'un en fazla miktarda bulunan bifidobacteria türü olduğunu göstermektedir (Alessandri ve ark., 2020). Bifidobacteria'nın hem kediler hem de köpekler dahil olmak üzere memeli türleri arasında evrensel şekilde dağıldığı rapor edilmektedir ve bağırsak kommensallerinin geniş konakçı kolonizasyon potansiyeli için gelişim içinde olduğu düşünülmektedir (Bunesova ve ark., 2014; Milani ve ark., 2017). Milani ve ark. (2017)'nin yapmış olduğu çalışmada analiz edilen memeli türlerinde ortalama >%0,01 nispi bollukta *Bifidobacterium* tespit edilmiştir. Bu çalışmada dikkati çeken bulgu kurt ve köpekler arasında *Bifidobacterium* miktarının karşılaştırılması ve sonuç olarak evcilleştirme ile kolonize olan türlerin sayısında artış olduğunu bulundurmasıdır. Ayrıca bu çalışmada, yedi farklı köpek ırkının profili çıkarılarak yapay seleksiyonun ve insanlarla etkileşimin etkisi de araştırılmıştır. Elde edilen veriler, köpeklerde evcilleştirme ve insanlarla birlikte yakın temasın giderek artmasının bir sonucu olarak Bifidobacteria popülasyonunun şekillendiğini göstermektedir ve Bifidobacteria artışının, insanlarla uzun süreli bir arada yaşamının bir sonucu olabileceği düşünülmektedir. Yapılan tez çalışmasında her iki grupta bulunan köpeklerde *Bifidobacterium*'un ortalama nispi bolluğu %0,01'den düşük ve neredeyse sıfıra yakın bir değer olarak bulunmuştur. *Bifidobacterium*'un depresyon ve anksiyete ile ilişkisi ve BDNF'nin anksiyete ile ilişkisi düşünüldüğünde Bifidobacterium miktarındaki azalma ve BDNF düzeylerindeki azalmanın bağlantılı olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu mekanizmayı anlamak için daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç olduğu gözlenmektedir.

Scher ve ark. (2013) romatoid artritli hastalar ile ve sağlıklı insanlardaki mikrobiyota profilini karşılaştırdıkları çalışmalarında *Prevotella copri*'nin tedavi edilmemiş romatoid artrit hastalarında sağlıklı bireylere göre daha fazla olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Bu konu ile ilgili daha sonra yapılan çalışmalar da bu bulguyu desteklemektedir (Pianta ve ark., 2017; Maeda ve Takeda, 2017; Maeda ve ark., 2016). Köpeklerde ağrı ve intestinal mikrobiyota profili arasındaki ilişkinin incelendiği bir çalışma olmasa da tez çalışmasındaki *Prevotella copri* verileri, yakın zamanda 96 sağlıklı köpek ile yapılan ve bu köpeklerin mikrobiyota profilini ortaya koyan çalışma verileri göz önünde bulundurularak yorumlanmıştır (You ve Kim,

2021). Bahsedilen bu çalışmada sağlıklı köpeklerin ortalama *Prevotella copri* nispi yüzdeleri 4,6 olarak verilmiştir. Yapılan tez çalışmasında ise her iki köpek grubunun ortalama *Prevotella copri* yüzdeleri 3,36 olarak bulunmuştur fakat çalışmaya katılan ve Helsinki kronik ağrı indeksine göre ağrı skoru ortalamasının üzerinde olan iki köpeğin ortalama *Prevotella copri* yüzdeleri 11,97 olarak tespit edilmiştir. Her iki köpeğin ana beslenme kaynağının kuru mama olması nedeni ile bu durumun insanlardaki romatoid artrite benzer şekilde ortopedik ağrı kaynaklı artmış olabileceği düşünülmüştür. Bu konuda daha ileri araştırmaların yapılmasının özellikle senyör köpeklerin ağrı yönetiminde önemli olacağı düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalar *Clostridium hiranonis*'in köpeklerde konakçı sağlığında ve normal mikrobiyotanın korunmasında önemli bir rol oynadığını göstermektedir (AlShawaqfeh ve ark., 2017; Pilla ve ark., 2020; Vazquez-Baeza ve ark., 2016). Geniş sprektrumlu antibiyotiklerin kullanımının mikrobiyota profilini negatif yönde etkilediği ve *Clostridium hiranonis*'in azaldığı görülmüştür (Chaitman ve ark., 2020; Pilla ve ark., 2020). *Clostridium hiranonis*'in azalması çalışmalarda genellikle kronik inflamatuvar enteropatiler ile ilişkili bulunmuştur (Blake ve ark., 2020; Giaretta ve ark., 2018; Wang ve ark., 2019). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ise disbiyozis durumunda bu bakteri popülasyonunda bir azalma olduğu gösterilmiştir (Giaretta ve ark., 2018; Pilla ve ark., 2020). Probiyotik takviyesi, diyet değişikliği veya fekal mikrobiyota transferi ile mikrobiyota profilinin normalleşmesiyle birlikte *Clostridium hiranonis* miktarının da normal seviyelere yükseleceği düşünülmektedir (Blake ve ark., 2020; Chaitman ve ark., 2020; Wang ve ark., 2019). Mevcut tez çalışmasında tüm köpeklerin *Clostridium hiranonis* ortalaması %0,05 olarak bulunmuştur. Köpeklerin hiç birinde kronik enteropati durumu olmadığı için *Clostridium hiranonis*'te şekillenen bu düşüklüğün yaşla birlikte şekillenmiş olabileceği ve hayat boyu kullanılan antibiyotik tedavilerinin bu duruma katkı sağlamış olabileceği düşünülmektedir.

SCFA'lar, doğal ve adaptif immün hücrelerin üretimini ve işlevini düzenlemektedirler. Özellikle bütirat nötrofillerin, makrofajların, dendritik hücrelerin ve efektör T hücrelerinin proinflamatuvar aktivite göstermesini inhibe ederek regülatör T hücrelerinin sayısını ve aktivitesini artırarak anti-inflamatuvar etki göstermektedir (Gonçalves ve ark., 2018). Yapılan tez çalışmasında yıllık aşılanmanın senyör köpeklerdeki kısa zincirli yağ asidi üzerine olan etkisi araştırılmış ve yıllık aşılanmanın senyör köpeklerde fekal numune içeriğindeki kısa zincirli yağ asidi miktarı üzerine etkisi olmadığı görülmüştür. Köpeklerde yaş ve diyet içeriğindeki karbonhidrat ve protein kaynağının kısa zincirli yağ asitleri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada yaşlanmanın kısa zincirli yağ asitleri üzerine bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Maria ve ark., 2017). Bu veriden yola çıkılarak gıda cevaplı enteropatisi olan köpeklerdeki fekal kısa zincirli yağ asidi profilinin incelendiği bir çalışmadaki sağlıklı kontrol grubunun kısa zincirli yağ asidi sonuçları ile karşılaştırma yapılmıştır (Higueras ve ark., 2021). Bu karşılaştırma sonucunda mevcut tez çalışmasındaki köpeklerin kısa zincirli yağ asidi bileşiminin gıda kaynaklı enteropatisi olan köpeklerin bileşimine benzerlik gösterdiği görülmüştür. Tez çalışmasına katılım gösteren köpeklerde enteropati durumunun olmayışı, bu benzerliğin köpek grupları arasında tüketilen gıda içeriklerinin farklı oluşu ve çevresel faktörler ile bağlantılı olabileceği düşünülmüştür. Tez çalışmasında örneklem sayısının az olması, örneklem gruplarında yaş dağılımının geniş olması, köpeklerden birisi hariç kuru mama ile beslenmelerine karşın farklı marka mamaların tüketimi sınırlayıcı faktörleri oluşturmaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yürütülen doktora tez projesinde her yıl düzenli olarak aşılanan köpeklerin kaygı, bilişsel fonksiyon durumu ve fekal mikrobiyota içeriği değerlendirilmiş ve aşının bu parametreler üzerinde etkisi olup olmadığı analiz edilmiştir. Yıllık aşılanmanın kronik immun sistem stimülasyonu nedeniyle proinflatuar ve antiinflatuar sitokinler arasındaki dengenin bozulmasına ve Th1 düzeyinde artışın şekillenmesine yol açabileceği hipotezine karşın yıllık aşılanan köpekler ve en az üç yıl önce aşılanmış köpek grupları arasında immun sistemin hazırlanması açısından anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir. Yıllık aşılanmanın senyör köpeklerde CCD ve kaygı bozukluğu geliştirme riski ile mikrobiyota profilleri üzerine anlamlı bir etkisi olmadığı da çalışma dahilinde gösterilmiştir.

Mevcut proje kapsamında gerçekleştirilen BDNF analizleri gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermemekle birlikte yaşlı köpeklerde artan kaygı ve azalan biliş seviyelerinin azalan BDNF seviyeleri ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Azalan BDNF seviyelerinin *Bifidobacterium* miktarındaki azalma ile uyumlu olması senyör köpeklerdeki artan kaygı davranışlarında kronik ağrı, azalan BDNF seviyeleri ve değişmiş mikrobiyota profillerini içeren çoklu mekanizmanın etkili olabileceği düşüncesini doğurmaktadır.

Çalışmaya katılan köpeklerin bilişsel fonksiyon durumunu anlamak için yapılan nesne seçim testi sonucunda aşılanmanın köpeklerin test performansı üzerinde bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Bununla birlikte fekal mikrobiyota analizi sonucunda nesne seçim testinde düşük performans gösteren köpeklerde Actinobacteria ve Coriobacteria sayısında anlamlı bir artış olduğu fark edilmiştir. Ayrıca Fusobacteria filumunda yaşlanma ile azalma eğilimi olduğu tespit edilmiştir. Helsinki Kronik Ağrı İndeksi ortalamasının üzerinde olan köpeklerde *Prevotella copri*'nin nispi bolluğunda artış olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak, senyör köpeklerde yıllık aşılamanın biliş ve bağırsak mikrobiyotası üzerine belirgin bir etkisinin olmamasına karşın yaşlanma sürecinde bağırsak-beyin ekseninin önemli ölçüde etkilendiği ve bu eksenin takibinin önemli olduğu bu tez çalışması ile ortaya konulmuştur. Yaşlanma ile ilişkili ortaya çıkabilecek kronik ağrı süreçleri ve bu süreçleri etkileyen değişmiş mikrobiyota profillerinin azalan BDNF seviyeleri ile ilişkili olabileceği ilk kez bu tez çalışması ile gösterilmiştir. Azalan BDNF seviyeleri ile artan kaygı seviyeleri arasındaki potansiyel ilişkinin ilk kez gösterilmiş olması yaşlı köpeklerde kaygı ile ilişkili davranışların potansiyel mekanizmalarının anlaşılması açısından önem arz etmektedir. Yaşla birlikte artan kaygının ağrı durumu ile şiddetlenmesi evcil hayvanların refahı açısından büyük risk teşkil etmektedir. Bu araştırma, ileriki çalışmalarda yaşlı köpeklerin kronik ağrı ve kaygı ile ilişkili davranış değişikliklerinin geniş bir perspektiften incelenmesi için temel oluşturması açısından önem arz etmektedir.

ÖZET

Yıllık Aşılamamanın Senyör Köpeklerde Kaygı, Bilişsel Fonksiyon Bozukluğu ve Fekal Mikrobiyota Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Aşılama protokollerinin doğru ve düzenli bir şekilde uygulanması evcil hayvanlar için hayati öneme sahiptir. İnfeksiyöz hastalıkları elimine etmek, çeşitli hastalıkların mortalite ve morbidite oranlarını azaltmak, zoonoz hastalıkların önüne geçmek amacıyla aşılama programlarının yürütülmesi daha sağlıklı bir popülasyon için en güvenilir profilaksi yöntemlerinden birisidir. Günümüzde, köpeklerde yıllık aşılamalar rutin olarak sürdürülmekte ve ülkemizde bu uygulama genellikle hayat boyu devam etmektedir. Buna karşın, köpeklerde hayat boyu aşılamamanın beyin ve bağırsak mikrobiyotası ile davranış üzerine olan etkileri ile ilgili herhangi bir çalışmanın olmaması literatürde önemli bir eksiklik olarak göze çarpmaktadır. Bu tez projesinin birincil amacı olan senyör köpeklerde (8 yaş ve üzeri) aşı uygulama yaşı ve sıklığının beyin ve kalın bağırsak mikrobiyotası üzerine etkilerinin ortaya konulmasını sağlamak amacı ile 16S rRNA sekanslama analizi, kısa zincirli yağ asitlerinin analizi ve flow sitometri analizi gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasının bir diğer amacı olan yaşlı köpeklerdeki kaygı ve bilişsel fonksiyon bozukluğu durumunu destekleyecek bir parametre olma potansiyeli bulunan beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) analizi de bu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda örneklem grubunu oluşturan köpek sahipleri tarafından cevaplanan ve köpeklerdeki hem kronik ağrı hem de bilişsel fonksiyon durumunu değerlendirmeye yardımcı olan anket formları kullanılmıştır. Ayrıca köpeklerin bilişsel fonksiyon durumunu değerlendirmek amacı ile bellek testi olan nesne seçim testi uygulanmıştır.

Her yıl düzenli aşılanan köpekler ve en az üç yıl önce aşılanmış köpekler arasında Th1/Th2 oranında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur ve yıllık aşılamamanın immun yanıt üzerinde etkisi olmadığı gözlenmiştir. Projenin verileri köpeklerde aşılamamanın BDNF seviyeleri üzerine anlamlı bir etkisinin olmamasına karşın yaşlanmaya bağlı olarak BDNF seviyelerinin azaldığını göstermektedir. Dahası bu proje kapsamında yaşlı köpeklerdeki BDNF ortalamalarının kaygı durumu ile ilişkili BDNF ortalamasına oldukça yakın olduğu da tespit edilmiştir. Bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda yaşlı köpeklerin öğrenme performanslarındaki azalma ve kaygı durumlarındaki artıştan normale göre düşük olan BDNF seviyelerinin sorumlu olduğu ileri sürülebilir. Sonuç olarak, mevcut veriler köpeklerde de insanlara benzer şekilde BDNF seviyelerinin sadece kaygı durumu ile değil aynı zamanda yaşlanma ile ilişkili olabileceğini göstermesi açısından önem arz etmektedir. Çalışmaya katılan köpeklerin %95'inde Helsinki Kronik Ağrı İndeksine göre kronik ağrı bulgusu olduğu gözlenmiştir. Yıllık aşılamamanın senyör köpeklerde fekal mikrobiyota bileşiminde etkili olmadığı gözlenmiştir fakat nesne seçim testinde düşük performans gösteren köpeklerde Actinobacteria ve Coriobacteria'nın anlamlı bir şekilde ($p \leq 0,05$) yüksek olduğu bulunmuştur. Fekal numuneler ile yapılan kısa zincirli yağ asitleri bileşiminde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Senyör köpeklerde yıllık aşılamamanın fekal mikrobiyota, kaygı, bilişsel fonksiyon bozukluğu üzerinde bir etkisinin olmadığı gösterilse de yaşla birlikte ağrı ve kaygı durumlarında yaşanan artışın yönetilmesi gerektiği, BDNF'nin bu süreçte bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: BDNF, Bilişsel Gerileme, Kaygı, Köpek, Yaşlanma

SUMMARY

Investigation of the Effects of Annual Vaccination on Anxiety, Canine Cognitive Dysfunction and Fecal Microbiota in Senior Dogs

It is crucial for companion animals to follow immunization protocols correctly and consistently. One of the most effective preventive strategies for a healthier population is the implementation of vaccination programs in order to eradicate infectious diseases, lower the mortality and morbidity rates of various diseases, and avoid zoonotic diseases. Today, annual vaccinations in dogs are carried out routinely and this practice typically lasts a lifetime. On the other hand, a significant gap in the literature is the lack of studies on the impact of lifelong vaccination on the brain and gut microbiome, as well as behavior, in dogs. The main goal of the thesis project, which is being supported by this project, is to shed light on the effects of vaccination age and frequency on the brain and large intestine microbiota in senior dogs (8 years and older). To this aim, in this project 16S rRNA sequencing analysis, analysis of short-chain fatty acids and flow cytometry analysis were performed to reveal the effects of age and frequency of vaccination on the brain and large intestine microbiota in senior dogs. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) analyzes, which have the potential to be a parameter to support anxiety and cognitive dysfunction in old dogs, which is another aim of the thesis study, were also carried out within the scope of this project. At the same time, questionnaire forms that the dog owners in the sample group answered and helped to evaluate both chronic pain and cognitive function status in dogs were used. In addition, the object discrimination test which is a memory test, was applied to evaluate the cognitive function status of the dogs.

Data of the project show that there was no significant difference in the Th1/Th2 ratio between dogs vaccinated regularly every year and dogs vaccinated at least three years ago, and it was observed that annual vaccination did not affect the immune response. Additionally vaccination does not have a significant effect on BDNF levels in dogs, BDNF levels decrease with aging. Moreover, within the scope of this project, it was determined that the BDNF averages in old dogs were quite close to the BDNF averages associated with anxiety. Considering these results, it can be argued that lower than normal BDNF levels are responsible for the decrease in learning performance and the increase in anxiety in older dogs. As a result, the available data show that BDNF levels in dogs, similar to humans, are not only related to anxiety but also to aging. It was observed that 95% of the dogs participating in the study had chronic pain findings according to the Helsinki Chronic Pain Index. It was observed that annual vaccination was not effective on fecal microbiota composition in senior dogs, but Actinobacteria and Coriobacteria were found to be significantly higher ($p \leq 0.05$) in dogs that performed poorly in the object discrimination test. No significant difference was found between the groups in short-chain fatty acids composition with fecal samples. Although it has been shown that annual vaccination in senior dogs does not affect fecal microbiota, anxiety and cognitive dysfunction, it is thought that the increase in pain and anxiety with age should be managed and BDNF can be used as a biomarker in this process.

Key words: Aging, Anxiety, BDNF, Cognitive decline, Dog

KAYNAKLAR

- ABDEL-HAQ R, SCHLACHETZKI J CM, GLASS CK, MAZMANIAN SK (2019). Microbiome–microglia connections via the gut–brain axis. *J Exp Med.* **216**: 41–59.
- ALESSANDRI G, MILANI C, MANCABELLI L, LONGHI G, ANZALONE R, LUGLI GA, DURANTI S, TURRONI F, OSSIPRANDI MC, VAN SINDEREN D, VENTURA M (2020). Deciphering the Bifidobacterial Populations within the Canine and Feline Gut Microbiota. *Appl Environ Microbiol.*, **86**(7): e02875-19.
- ALLALI I, ARNOLD JW, ROACH J, CADENAS MB, BUTZ N, HASSAN HM, KOCI M, BALLOU A, MENDOZA M, ALI R, AZCARATE-PERIL MA (2017). A comparison of sequencing platforms and bioinformatics pipelines for compositional analysis of the gut microbiome. *BMC Microbiol.*, **17**(1): 194.
- ALSHAWAQFEH MK, WAJID B, MINAMOTO Y, MARKEL M, LIDBURY JA, STEINER JM, SERPEDIN E, SUCHODOLSKI JS (2017). A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. *FEMS Microbiol Ecol.*, **93**(11).
- ALSHAWAQFEH MK, WAJID B, MINAMOTO Y, MARKEL M, LIDBURY JA, STEINER JM, SERPEDIN E, SUCHODOLSKI JS (2017). A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. *FEMS Microbiol Ecol.* **93**(11).
- AMBROSINI YM, BORCHERDING D, KANTHASAMY A, KIM HJ, WILLETTE AA, JERGENS A, ALLENSPACH K, MOCHEL JP (2019). The gut-brain axis in neurodegenerative diseases and relevance of the canine model: a review. *Front Aging Neurosci.* **11**: 130.
- AMBROSINI YM, BORCHERDING D, KANTHASAMY A, KIM HJ, WILLETTE AA, JERGENS A, ALLENSPACH K, MOCHEL JP (2019). The Gut-Brain Axis in Neurodegenerative Diseases and Relevance of the Canine Model: A Review. *Front Aging Neurosci.*, **11**: 130.
- ANISMAN H, MERALI Z (2003). Cytokines, stress and depressive illness: brain–immune interactions. *Ann. Med.* **35**: 2 – 11.
- APPLETON J (2018). The Gut-Brain Axis: Influence of Microbiota on Mood and Mental Health. *Integr Med (Encinitas).*, **17**(4): 28-32.
- ARBOLEYA S, STANTON C, RYAN CA, DEMPSEY E, ROSS PR (2016). Bosom Buddies: the symbiotic relationship between infants and Bifidobacterium longum ssp. longum and ssp. infantis. Genetic and probiotic features. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, **7**: 1–21.
- ARESTI SANZ J, EL AIDY S (2019). Microbiota and gut neuropeptides: a dual action of antimicrobial activity and neuroimmune response. *Psychopharmacology*, **236**: 1597–1609.
- ARPAIA N, CAMPBELL C, FAN X, DIKIY S, VEEKEN J, DEROOS P, CROSS J R, PFEFFER K, COFFER PJ, RUDENSKY AY (2013). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, **504**: 451-455.
- ATARASHI K, TANOUE T, SHIMA T, IMAOKA A, KUWAHARA T, MOMOSE Y, CHENG G, YAMASAKI S, SAITO T, OHBA Y, TANIGUCHI T, TAKEDA K, HORI S, IVANOV II, UMESAKI Y, ITOH K, HONDA K (2011). Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science*, **331**: 337–41.
- AUTHIER FJ, CHERIN P, CREANGE A, BONNOTTE B, FERRER X, ABDELMOUMNI A, RANOUX D, PELLETIER J, FIGARELLA-BRANGER D, GRANEL B, MAISONOBE T, COQUET M, DEGOS JD, GHERARDI RK (2001). Central nervous system disease in patients with macrophagic myofasciitis. *Brain*, **124**(5): 974-83.
- AWATE S, BABIUK L AB, MUTWIRI G (2013). Mechanisms of action of adjuvants. *Front. Immunol.* **4**: 114.

- AXELSSON E, RATNAKUMAR A, ARENDT ML, MAQBOOL K, WEBSTER MT, PERLOSKI M, LIBERG O, ARNEMO JM, HEDHAMMAR A, LINDBLAD-TOH K (2013). The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet. *Nature*, **495**: 360–364.
- AZKONA G, GARCÍA-BELENQUER S, CHACON G, ROSADO B, LEON M, PALACÍO J (2009). Prevalence and risk factors of behavioural changes associated with age-related cognitive impairment in geriatric dogs. *J Small Animal Pract.* **50**(2): 87–91.
- BARNARD S, WELLS DL, HEPPER PG, MILLIGAN AD (2017). Association between lateral bias and personality traits in the domestic dog (*Canis familiaris*). *Journal of Comparative Psychology*, **131**(3): 246.
- BARRETT E, ROSS RP, O'TOOLE PW, FITZGERALD GF, STANTON C (2012). γ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *J. Appl. Microbiol.*, **113**: 411–417.
- BARRY KA, MIDDELBOSS IS, VESTER BOLER BM, DOWD SE, SUCHODOLSKI JS, HENRISSAT B, COUTINHO PM, WHITE BA, FAHEY GC JR, SWANSON KS (2012). Effects of dietary fiber on the feline gastrointestinal metagenome. *J Proteome Res.*, **11**(12): 5924–33.
- BECKMAN K B, AMES BN (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* **78**: 547–581.
- BELKAÏD Y, HAND TW (2014). Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*, **157**: 121–141.
- BELLOWS J, COLITZ CM, DARISTOTLE L, INGRAM DK, LEPIE A, MARKS SL (2015). Common physical and functional changes associated with aging in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* **246**: 67–75.
- BENJAMINI E, LESKOWITZ S (1991). Immunology : A Short Course.
- BENSKY MK, GOSLING SD, SINN DL (2013). The world from a dog's point of view: a review and synthesis of dog cognition research. *Adv. Study Behav.*, **45**: 209–406.
- BERMINGHAM EN, MACLEAN P, THOMAS DG, CAVE NJ, YOUNG W (2017). Key bacterial families (Clostridiaceae, Erysipelotrichaceae and Bacteroidaceae) are related to the digestion of protein and energy in dogs. *PeerJ.* **5**: e3019.
- BERMINGHAM EN, YOUNG W, BUTOWSKI CF, MOON CD, MACLEAN PH, ROSENDALE D, CAVE N J, THOMAS DG (2018). The fecal microbiota in the domestic cat (*Felis catus*) is influenced by interactions between age and diet; A Five Year Longitudinal Study. *Front Microbiol.* **9**:1231.
- BERMINGHAM EN, YOUNG W, KITTELMANN S, KERR KR, SWANSON KS, ROY NC, THOMAS DG (2013). Dietary format alters fecal bacterial populations in the domestic cat (*Felis catus*). *Microbiology open*, **2**:173–81.
- BERRY ASF, KELLY BJ, BARNHART D, KELLY DJ, BEITING DP, BALDASSANO RN, REDDING LE (2019). Gut Microbiota Features Associated with *Clostridioides Difficile* Colonization in Puppies. *PLoS ONE*, **14**: e0215497.
- BHATTACHARJEE S, LUKIŦ WJ (2013). Alzheimer's disease and the microbiome. *Front Cell Neurosci.*, **7**:153.
- BIAGI E, NYLUND L, CANDELA M, OSPAN R, BUCCI L, PINI E, NIKKILA J, MONTI D, SATOKARI R, FRANCESCHI C, BRIGIDI P, DE VOS W (2010). Through ageing and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS One*, **5**: e10667.
- BIENENSTOCK J, KUNZE W, FORSYTHE P (2015). Microbiota and the gut-brain axis. *Nutr Rev.*, **1**: 28–31.

- BLAKE A, CIGARROA A, KLEIN H, KHATTAB M, KEATING T, COEVERING PV, LIDBURY JA, STEINER JM, SUCHODOLSKI JS (2020). Developmental stages in microbiota, bile acids, and clostridial species in healthy puppies. *J Vet Intern Med.*, **1**:12.
- BLAYLOCK RL (2012). Aluminum induced immunoexcitotoxicity in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. *Curr Inorg Chem.*, **2**(1): 46–53.
- BLAYLOCK RL (2013) Immunology primer for neurosurgeons and neurologists part 2: Innate brain immunity. *Surg Neurol Int.*, **4**: 118.
- BLOUNT DG, PRITCHARD DI, HEATON PR (2005). Age-related alterations to immune parameters in Labrador retriever dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **108**: 399–407.
- BOHM M, THOMPSON H, WEIR A, HASTED AM, MAXWELL NS, HERRTAGE ME (2004). Serum antibody titres to canine parvovirus, adenovirus and distemper virus in dogs in the UK which had not been vaccinated for at least three years. *Vet. Rec.*, **154**: 457–463.
- BOLGER AM, LOHSE M, USADEL B (2014). “Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data.” *Bioinformatics*, **30** (15): 2114–20.
- BORRELLI L, ACETO S, AGNISOLA C, DE PAOLO S, DIPINETO L, STILLING RM, DINAN TG, CRYAN JF, MENNA LF, FIORETTI A (2016). Probiotic modulation of the microbiota-gut-brain axis and behaviour in zebrafish. *Sci Rep.*, **6**: 30046.
- BOSCH MN, PUGLIESE M, GIMENO-BAYÓN J, RODRÍGUEZ MJ, MAHY N (2012). Dogs with cognitive dysfunction syndrome: a natural model of Alzheimer’s disease. *Curr Alzheimer Res.*, **9**: 298–314.
- BOSCO, N., NOTI, M (2021). The aging gut microbiome and its impact on host immunity. *Genes Immun.*, **22**: 289–303.
- BOUCARD AS, THOMAS M, LEBON W, POLACK B, FLORENT I, LANGELLA P, BERMÚDEZ-HUMARÁN LG (2021). Age and Giardia intestinalis Infection Impact Canine Gut Microbiota. *Microorganisms*. **9**: 1862.
- BOUCHARD G, PLATA-MADRID H, YOUNGQUIST RS, BUENING GM, GANJAM VK, KRAUSE GF, ALLEN GK, PAINE AL (1992). Absorption of an alternate source of immunoglobulin in pups. *Am. J. Vet. Res.*, **153**: 230–233.
- BOYKO AR (2011). The domestic dog: man’s best friend in the genomic era. *Genome Biol.*, **12**: 216.
- BRANISTE V, AL-ASMAKH M, KOWAL C, ANUAR F, ABBASPOUR A, TÓTH M, KORECKA A, BAKOCEVIC N, NG LG, KUNDU P, GULYÁS B, HALLDIN C, HULTENBY K, NILSSON H, HEBERT H, VOLPE BT, DIAMOND B, PETTERSSON S (2014). The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med.*, **6**(263): 263ra158.
- BRAVO JA, FORSYTHE P, CHEW MV, ESCARAVAGE E, SAVIGNAC HM, DINAN TG, BIENENSTOCK J, CRYAN JF (2011). Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **108**: 16050–16055.
- BRIGHT J M, MEARS E (1997). Chronic heart disease and its management. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, **27**: 1305–1329.
- BROWNING KN, TRAVAGLI RA (2014). Central nervous system control of gastrointestinal motility and secretion and modulation of gastrointestinal functions. *Compr. Physiol.*, **4**: 1339–1368.
- BUNESOVA V, VLKOVA E, RADA V, KILLER J, MUSILOVA S (2014). Bifidobacteria from the gastrointestinal tract of animals: differences and similarities. *Benef Microbes.*, **5**: 377–388.
- CALVANI R, PICCA A, LO MONACO MR, LANDI F, BERNABEI R, MARZETTI E (2018). Of microbes and minds: a narrative review on the second brain aging. *Front Med.*, **5**: 53.

- CARMICHAEL L E (1999). Canine viral vaccines at a turning point—a personal perspective. *Adv Vet Med.*, **41**: 289–307.
- CARMICHAEL LE, ROBSON DS, BARNES FD (1962). Transfer and Decline of Maternal Infectious Canine Hepatitis Antibody in Puppies. *Exp. Biol. Med.*, **109**: 677–681.
- CATTANEO A, CATTANE N, GALLUZZI S, PROVASI S, LOPIZZO N, FESTARI C, FERRARI C, GUERRA UP, PAGHERA B, MUSCIO C, BIANCHETTI A, VOLTA GD, TURLA M, COTELLI MS, GENNUSO M, PRELLER A, ZANETTI O, LUSSIGNOLI G, MIRAABILE D, BELLANDI D, GENTILE S, BELOTTI G, VILLANI D, HARACH T, BOLMONT T, PADOVANI A, BOCCARDI M, FRISONI G (2017). Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. *Neurobiol. Aging.*, **49**: 60–68.
- CAZZULLO CL, SACCHETTI E, GALLUZZO A, PANARIELLO A, COLOMBO F, ZAGLIANI A, CLERICI M (2001). Cytokine profiles in drug-naïve schizophrenic patients. *Schizophr. Res.*, **47**: 293 – 298.
- CAZZULLO CL, SCARONE S, GRASSI B, VISMARÀ C, TRABATTONI D, CLERICI M (1998). Cytokines production in chronic schizophrenia patients with or without paranoid behaviour. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry.*, **22**: 947 – 957
- CHAITMAN J, ZIESE AL, PILLA R, MINAMOTO Y, BLAKE AB, GUARD BC, ISIAH A, LIDBURY JA, STEINER JM, UNTERER S, SUCHODOLSKI JS (2020). Fecal Microbial and Metabolic Profiles in Dogs With Acute Diarrhea Receiving Either Fecal Microbiota Transplantation or Oral Metronidazole. *Front Vet Sci.*, **7**: 192.
- CHAITMAN J, ZIESE AL, PILLA R, MINAMOTO Y, BLAKE AB, GUARD BC, ISIAH A, LIDBURY JA, STEINER JM, UNTERER S, SUCHODOLSKI JS (2020). Fecal microbial and metabolic profiles in dogs with acute diarrhea receiving either fecal microbiota transplantation or oral metronidazole. *Front Vet Sci.*, **7**: 192.
- CHAN A D, NIPPAK P, MURPHEY H, IKEDA-DOUGLAS CJ, MUGGENBURG B, HEAD E, COTMAN CW, MILGRAM NW (2002). Visuospatial impairments in aged canines (Canis familiaris): the role of cognitive-behavioral flexibility. *Behav Neurosci.*, **116**(3): 443.
- CHAPPUIS G (1995). Control of canine distemper. *Vet. Microbiol.*, **44**: 351–358.
- CHAPPUIS G (1998). Neonatal immunity and immunisation in early age: Lessons from veterinary medicine. *Vaccine*. **16**: 1468–1472.
- CHASTANT-MAILLARD S, AGGOUNI C (2017). Canine and feline colostrum. *Reprod. Domest. Anim.*, **52**: 148–152.
- CHEN TT, LONG WM, ZHANG CH, LIU S, ZHAO LP, HAMAKER BR (2017). Fiber-utilizing capacity varies in Prevotella- versus Bacteroides- dominated gut microbiota. *Sci Rep.*, **7**: 2594.
- CHERRINGTON CA, HINTON M, PEARSON GR, CHOPRA I (1991). Short-chain organic acids at pH 5.0 kill Escherichia coli and Salmonella spp. without causing membrane perturbation. *J Appl Bacteriol.*, **70**: 161-165.
- CIGARROA A, SUCHODOLSKI J S (2018). Assessing the development of the postnatal canine gastrointestinal microbiome utilizing the dysbiosis index. Proceedings of the National Veterinary Scholars Symposium. College Station, TX.
- CLARKE G, GRENHAM S, SCULLY P, FITZGERALD P, MOLONEY RD, SHANAHAN F, DINAN TG, CRYAN JF (2013). The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol Psychiatry.*, **18**(6): 666-73.
- CLEM A S (2011). Fundamentals of vaccine immunology. *Journal of Global Infectious Diseases*. **3**(1): 373–8.

- COLLE MA, HAUW JJ, CRESPEAU F, UCHIYAMA T, AKIYAMA H, CHECLER F, PAGEAT P, DUYKAERTS C (2000). Vascular and parenchymal A beta deposition in the aging dog: correlation with behavior. *Neurobiol Aging*. **21**: 695–704.
- COLLINS S M, SURETTE M, BERCİK P (2012). The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat. Rev. Microbiol.* (10): 735–742.
- COTMAN CW, HEAD E (2008). The canine (dog) model of human aging and disease: dietary, environmental and immunotherapy approaches. *J Alzheimer's Dis.*, **15**: 685–707.
- COTMAN CW, HEAD E, MUGGENBURG BA, ZICKER S, MILGRAM NW (2002). Brain aging in the canine: a diet enriched in antioxidants reduces cognitive dysfunction. *Neurobiol Aging*., **23**(5): 809–818.
- COUETTE M, BOISSE MF, MAISON P, BRUGIERES P, CESARO P, CHEVALIER X, GHERARDI RK, BACHOU-LEVI AC, AUTHIER FJ (2009). Long-term persistence of vaccine-derived aluminum hydroxide is associated with chronic cognitive dysfunction. *J Inorg Biochem.*, **103**(11): 1571-8.
- CREEVY KE, GRADY J, LITTLE SE, MOORE GE, STRICKLER BG, THOMPSON S, WEBB JA (2019). 2019 AAHA Canine Life Stage Guidelines. *J Am Anim Hosp Assoc.*, **55**(6): 267-290.
- CRYAN JF, DINAN TG (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.*, **13**: 701–712.
- CRYAN JF, O'RIORDAN KJ, COWAN CSM, SANDHU KV, BASTIAANSEN TFS, BOEHME M, CODAGNONE MG, CUSSOTTO S, FULLING C, GOLUBEVA AV, GUZZETTA KE, JAGGAR M, LONG-SMITH CM, LYTE JM, MARTIN JA, MOLINERO-PEREZ A, MOLONEY G, MORELLI E, MORILLAS E, O'CONNOR R, CRUZ-PEREIRA JS, PETERSON VL, REA K, RITZ NL, SHERWIN E, SPICHAK S, TEICHMAN EM, VAN DE WOUW M, VENTURA-SILVA AP, WALLACE-FITZSIMONS SE, HYLAND N, CLARKE G, DINAN TG (2019). The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol Rev.*, **99**(4): 1877-2013.
- CUMMINGS BJ, HEAD E, RUEHL W, MILGRAM NW, COTMAN CW (1996). The canine as an animal model of human aging and dementia. *Neurobiol. Aging*., **17**: 259–268.
- CUMMINGS BJ, PIKE CJ, SHANKLE R, COTMAN CW (1996). β -amyloid deposition and other measures of neuropathology predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*., **17**: 921–933.
- CUMMINGS JH, ANTOÏNE JM, AZPIROZ F, BOURDET-SICARD R, BRANDTZAEG P, CALDER PC, GIBSON GR, GUARNER F, ISOLAURI E, PANNEMANS D, SHORTT C, TUIJTELAARS S, WATZL B (2004). PASSCLAIM - Gut health and immunity. *Eur J Nutr.*, **43**: 118–73.
- DA COSTA C, WALKER B, BONAVIA A (2015). Tuberculosis vaccines -State of the art, and novel approaches to vaccine development. *International Journal of Infectious Diseases*. **32**: 5-12.
- DALILE B, VAN OUDENHOVE L, VERVLIET B, VERBEKE K (2019). The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **16**: 461–478.
- DANTZER R (2001). Cytokine-induced sickness behavior: Where do we stand? *Brain Behav Immun.*, **15**: 7-24.
- DANTZER R (2009). Cytokine, sickness behavior, and depression. *Immunol. Allergy Clin. North Am.*, **29**: 247-264.
- DAY M (2007). Immune System Development in the Dog and Cat. *J. Comp. Pathol.*, **137**: 10–15.
- DAY M J, SCHULTZ R D (2014). Veterinary Immunology: Principles and Practice.

- DAY M J, HORZINEK MC, SCHULTZ R, SQUIRES RA (2016). Vaccination guidelines group (VGG) of the world small animal veterinary association (WSAVA) WSAVA Guidelines for the vaccination of dogs and cats. *J. Small Anim. Pract.*, **57**: 4-8.
- DAY MJ (2010). Ageing, Immunosenescence and Inflammageing in the Dog and Cat. *J. Comp. Pathol.*, **142**: 60–69.
- DEMIRTAS A, OZTURK H, SUDAGIDAN M, KEYVAN E, YAVUZ O, GULAY OY, MUSA SAA (2019). Effects of commercial aldehydes from green leaf volatiles (green odour) on rumen microbial population and fermentation profile in an artificial rumen (Rusitec). *Anaerobe*, **55**: 83-92.
- DENG P, SWANSON KS (2015). Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. *Br J Nutr.*, **113**: 6–17.
- DESAI AR, MUSIL KM, CARR AP, HILL JE (2009). Characterization and quantification of feline fecal microbiota using cpn60 sequence-based methods and investigation of animal-to-animal variation in microbial population structure. *Vet Microbiol.*, **137**(1-2): 120-8.
- DESBONNET L, GARRETT L, CLARKE G, KIELY B, CRYAN JF, DINAN TG (2010). Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression. *Neuroscience*, **170**(4): 1179-88.
- DEVIKA NT, RAMAN K (2019). Deciphering the metabolic capabilities of bifidobacteria using genome-scale metabolic models. *Sci. Rep.*, **9**: 18222.
- DEWEY CW, DAVIES ES, XIE H, WAKSHLAG JJ (2019). Canine cognitive dysfunction: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, **49**: 477–499.
- DIMSDALE JE (2008). Psychological stress and cardiovascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **51**: 1237-1246.
- DINAN TG, QUIGLEY EMM, AHMED SMM, SCULLY P, O'BRIEN S, O'MAHONY L, O'MAHONY S, SHANAHAN F, KEELING PW (2006). Hypothalamic-pituitary-gut axis dysregulation in irritable bowel syndrome: plasma cytokines as a potential biomarker? *Gastroenterology*. **130**: 304–311.
- DUBAS-SLEMP H, MARMUROWSKA-MICHALOWSKA H, SZUSTER-CIESIELSKA A, KAMINSKA T, KANDEFER-SZERSZEN M (2003). The role of cytokines in depression. *Psychiat Pol.*, **37**: 787 – 798.
- EISENBARTH SC, COLEGIO OR, O'CONNOR W, SUTTERWALA FS, FLAVELL RA (2008). Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature*, **453**(7198): 1122-6.
- ELLIS J, GOW S, RHODES C, LACOSTE S, KONG L, MUSIL K, SNEAD E (2016). Serum antibody responses to vaccinal antigens in lean and obese geriatric dogs. *Can. Vet. J.*, **57**: 531–534.
- ELLIS J, MARZIANI E, AZIZ C, BROWN CM, COHN LA, LEA C, MOORE G E, TANEJA N (2022). AAHA Canine Vaccination Guidelines. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, **58**: 213–230.
- EMERY DC, SHOEMARK DK, BATSTONE TE, WATERFALL CM, COGHILL JA, CERAJEWSKA TL, DAVIES M, WEST NX, ALLEN SJ (2017). 16S rRNA next generation sequencing analysis shows bacteria in Alzheimer's Post-Mortem Brain. *Front. Aging Neurosci.*, **9**: 1–13.
- EXLEY C, SIESJO P, ERIKSSON H (2010). The immunobiology of aluminium adjuvants: how do they really work? *Trends Immunol.*, **31**(3): 103–9.
- FASSHAUER M, BLÜHER M (2015). Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol Sci.*, **36**: 461–70.

- FERRUCCI L, FABBRI E (2018). Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol.*, **15**: 505–22.
- FLINT HJ (2011). Obesity and the gut microbiota. *J. Clin. Gastroenterol.*, **45**: 128–132.
- FRANZOSA EA, SIROTA-MADI A, AVILA-PACHECO J, FORNELOS N, HAISER HJ, REINKER S, VATANEN T, HALL AB, MALLICK H, MCIVER LJ, SAUK JS, WILSON R G, STEVENS BW, SCOTT JM, PIERCE K, DEIK AA, BULLOCK K, IMHANN F, PORTER JA, ZHERNAKOVA A, FU J, WEERSMA RK, WIJMENG C, CLISH CB, VLAMAKIS H, HUTTENHOWER C, XAVIER R (2019). Gut Microbiome Structure and Metabolic Activity in Inflammatory Bowel Disease. *Nat. Microbiol.*, **4**: 293–305.
- FREYBURGER L, MARCHETEAU E, THOUMIRE S, RAVIER J, REYNAUD K, CHASTANT-MAILLARD S (2012). Timing of the Intestinal Barrier Closure in Puppies. *Reprod. Domest. Anim.*, **47**: 190–193.
- FROST G, SLEETH ML, SAHURİ-ARİSOYLU M, LÍZARBE B, CERDAN S, BRODY L, ANASTASOVSKA J, GHOURAB S, HANKİR M, ZHANG S, CARLİNG D, SWANN JR, GIBSON G, VIARDOT A, MORRİSON D, THOMAS EL, BELL JD (2014). The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat Commun.*, **5**: 3611.
- FULMER AE, LAVEN LJ, HILL KE (2022). Quality of life measurement in dogs and cats: A scoping review of generic tools. *Animals*. **12**: 400.
- FUNG T C, OLSON CA, HSIAO EY (2017). Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat Neurosci.*, **20**: 145–55.
- FUNG T C, OLSON CA, HSIAO EY (2017). Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat Neurosci.*, **20**: 145–55.
- GABORIAU-ROUTHIAU V, RAKOTOBÉ S, LECUYER E, MULDER I, LAN A, BRIDONNEAU C, ROCHET V, PISI A, DE PAEPE M, BRANDI G, EBERL G, SNEL J, KELLY D, CERF-BENSUSSAN N (2009). The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity.*, **31**(4): 677–89.
- GANGULI R, BRAR JS, SOLOMON W, CHENGAPPA KN, RABIN BS (1992). Altered interleukin-2 production in schizophrenia: association between clinical state and autoantibody production. *Psychiatry Res.*, **44**: 113 – 123.
- GANGULI R, RABIN BS, BELLE SH (1989). Decreased interleukin-2 production in schizophrenic patients. *Biol. Psychiatry.*, **26**: 427 – 430.
- GARCIA-MAZCORRO JF, KAWAS JR, LICONA CASSANI C, MERTENS-TALCOTT S, NORATTO G (2020). Different analysis strategies of 16S rRNA gene data from rodent studies generate contrasting views of gut bacterial communities associated with diet, health and obesity. *PeerJ.*, **8**: e10372.
- GARÇON N, WETTENDORFF M, VAN MECHELEN M (2011). Role of AS04 in human papillomavirus vaccine: Mode of action and clinical profile. *Expert Opinion on Biological Therapy*. **11**(5): 667-677.
- GARRIGUES Q, APPER E, CHASTANT S, MILA H (2022). Gut microbiota development in the growing dog: a dynamic process influenced by maternal, environmental and host factors. *Front Vet Sci.*, **9**: 964649.
- GASBARRINI G, MONTALTO M (1999). Structure and function of tight junctions. Role in intestinal barrier. *Ital J Gastroenterol Hepatol.*, **31**: 481-488.
- GBD (2018). Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*, **392**: 1736–88.

- GEVA-ZATORSKY N, SEFIK E, KUA L, PASMAN L, TAN T G, ORTIZ-LOPEZ A, YANORTSANG TB, YANG L, JUPP R, MATHIS D, BENOIST C, KASPER DL (2017). Mining the Human Gut Microbiota for Immunomodulatory Organisms. *Cell*. **168**: 928–943.
- GEVERS D, KUGATHASAN S, DENSON LA, VÁZQUEZ-BAEZA Y, VAN TREUREN W, REN B, SCHWAGER E, KNIGHTS D, SONG SJ, YASSOUR M, MORGAN XC, KOSTIC AD, LUO C, GONZÁLEZ A, MCDONALD D, HABERMAN Y, WALTERS T, BAKER S, ROSH J, STEPHENS M, HEYMAN M, MARKOWITZ J, BALDASSANO R, GRIFFITHS A, SYLVESTER F, MACK D, KIM S, CRANDALL W, HYAMS J, HUTTENHOWER C, KNIGHT R, XAVIER RJ (2014). The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe*, **15**(3): 382–392.
- GHERARDI R, AUTHIER F (2012). Macrophagic myofasciitis: characterization and pathophysiology. *Lupus*, **21**(2): 184–9.
- GIANNOTTA G, GIANNOTTA N (2018). Vaccines and Neuroinflammation. *Int J Pub Health Safe*, **3**: 3.
- GIARETTA PR, RECH RR, GUARD BC, BLAKE A, BLICK AK, STEINER JM, LIDBURY JA, COOK AK, HANİFEH M, SPİLLMANN T, KİLPİNEN S, SYRJA P, SUCHODOSKİ JS (2018). Comparison of intestinal expression of the apical sodium-dependent bile acid transporter between dogs with and without chronic inflammatory enteropathy. *J Vet Intern Med*, **32**: 1918–1926.
- GIARETTA PR, RECH RR, GUARD BC, BLAKE AB, BLICK AK, STEINER JM, LIDBURY JA, COOK AK, HANİFEH M, SPİLLMANN T, KİLPİNEN S, SYRJÄ P, SUCHODOLSKI JS (2018). Comparison of intestinal expression of the apical sodium-dependent bile acid transporter between dogs with and without chronic inflammatory enteropathy. *J Vet Intern Med*, **32**(6): 1918–1926.
- GOLDSBY RA, KINDT TJ, OSBORNE BA, KUBY J (2003). Immunology.
- GONÇALVES P, ARAÚJO JR, DI SANTO JP (2018). A Cross-Talk Between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and the Host Mucosal Immune System Regulates Intestinal Homeostasis and Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*, **24**(3): 558–572.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ Á, ROSADO B, PESİNİ P (2011). Plasma β -amyloid peptides in canine aging and cognitive dysfunction as a model of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*, **46**(7): 590–596.
- GÖTZ J, ITTNER LM, SCHONROCK N, CAPPAL R (2008). An update on the toxicity of A β in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, **4**: 1033–1042.
- GRASSET E, PUEL A, CHARPENTIER J, COLLET X, CHRISTENSEN JE, TERCÉ F, CHRISTENSEN JE, TERCE F, BURCELİN R (2017). A specific gut microbiota dysbiosis of type 2 diabetic mice induces GLP-1 resistance through an enteric NO-dependent and gut-brain axis mechanism. *Cell Metab*, **25**: 1075–1090.
- GRAY LK, CRAWFORD PC, LEVY JK, DUBOVI EJ (2012). Comparison of two assays for detection of antibodies against canine parvovirus and canine distemper virus in dogs admitted to a Florida animal shelter. *J Am Vet Med Assoc*, **240**: 1084–7.
- GREELEY E, KEALY R, BALLAM J, LAWLER D, SEGRE M (1996). The influence of age on the canine immune system. *Vet. Immunol. Immunopathol*, **55**: 1–10.
- GREELEY EH, BALLAM JM, HARRISON JM, KEALY RD, LAWLER DF, SEGRE M (2001). The influence of age and gender on the immune system: A longitudinal study in Labrador Retriever dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol*, **82**: 57–71.
- GRENHAM S, CLARKE G, CRYAN JF, DİNAN TG (2011). Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Front. Physiol*, **2**: 94.

- GRIDER JR, PILAND BE (2007). The peristaltic reflex induced by short-chain fatty acids is mediated by sequential release of 5-HT and neuronal CGRP but not BDNF. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **292**: 429–437.
- GUARD BC, MILA H, STEINER JM, MARIANI C, SUCHODOLSKI JS, CHASTANT-MAILLARD S (2017). Characterization of the fecal microbiome during neonatal and early pediatric development in puppies. *PLoS ONE*. **12**: e0175718.
- GUERENO MT, DÍEZ R (2002). Cytokines and psychiatry. *Vertex*. **13**: 111-119.
- GUREJE O, VON KORFF M, SIMON GE, GATER R (1998). Persistent pain and well-being: A World Health Organization study in primary care. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **280**: 147–151.
- HAMER HM, JONKERS D, VENEMA K, VANHOUTVIN S, TROOST FJ, BRUMMER RJ (2008). Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther.*, **27**(2): 104–19.
- HAN SK, KIM JK, JOO MK, LEE KE, HAN SW, KIM DH (2020). *Lactobacillus reuteri* Nk33 and *Bifidobacterium adolescentis* Nk98 alleviate *Escherichia coli*-induced depression and gut dysbiosis in mice. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **30**: 1222–1226.
- HAND D, WALLIS C, COLYER A, PENN CW (2013). Pyrosequencing the canine faecal microbiota: breadth and depth of biodiversity. *PLoS ONE*. **8**: e53115.
- HANDL S, DOWD SE, GARCIA-MAZCORRO JF, STEINER JM, SUCHODOLSKI JS (2011). Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS Microbiol Ecol.*, **76**(2): 301-10.
- HANDL S, WEHR U, ZENTEK J, KRAMMER-LUKAS S (2009). Histological and immunohistochemical evaluation of duodenal and colonic biopsies after oral bovine lactoferrin supplementation in beagle puppies. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, **93**: 76–82.
- HARGIS KE, BLALOCK EM (2017). Transcriptional signatures of brain aging and Alzheimer's disease: what are our rodent models telling us? *Behav. Brain Res.*, **322**: 311–328.
- HARMAN D (1956). Aging, a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.*, **11**: 298–300.
- HAYWARD JJ, CASTELHANO MG, OLIVEIRA KC, COREY E, BALKMAN C, BAXTER TL, CASAL ML, CENTER SA, FANG M, GARRISON SJ, KALLA SE, KORNILIEV P, KOTLIKOFF MI, MOISE NS, SHANNON LM, SIMPSON KW, SUTTER NB, TODHUNTER RJ, BOYKO AR (2016). Complex disease and phenotype mapping in the domestic dog. *Nat. Commun.*, **7**: 10460.
- HEAD E (2011). Neurobiology of the aging dog. *Age*, **33**: 485–496.
- HEAD E (2013). A canine model of human aging and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1832**: 1384–1389.
- HEATON PR, BLOUNT DG, DEVLIN P, KOELSCH S, MANN SJ, SMITH BHE, STEVENSON J, HARPER EJ (2002). Assessing age-related changes in peripheral blood leukocyte phenotypes in Labrador retriever dogs using flow cytometry. *J. Nutr.*, **132**: 1655–1657.
- HECHT J, RICE ES (2015). Citizen science: a new direction in canine behavior research. *Behav. Processes.*, **110**: 125–132.
- HEDDLE RJ, ROWLEY D (1975). Dog Immunoglobulins. *Immunology*. **29**: 185–195.
- HEIJTZ RD, WANG S, ANUAR F, QIAN Y, BJÖRKHOLM B, SAMUELSSON A, HIBBERD ML, FORSSBERG H, PETTERSSON S (2011). Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **108**: 3047-3052.

- HERNANDEZ J, RHIMI S, KRIAA A, MARIAULE V, BOUDAYA H, DRUT A, JABLAOUI A, MKAOUAR H, SAIDI A, BIOURGE V, BORG M A, RHIMI M, MAGUIN E (2022). Domestic environment and gut microbiota: lessons from pet dogs. *Microorganisms*. **10**:949.
- HIGUERAS C, REY AI, ESCUDERO R, DÍAZ-REGAÑÓN D, RODRÍGUEZ-FRANCO F, GARCÍA-SANCHO M, AGULLA B, SAINZ A (2021). Short-Chain and Total Fatty Acid Profile of Faeces or Plasma as Predictors of Food-Responsive Enteropathy in Dogs: A Preliminary Study. *Animals*, **12**(1): 89.
- HJERTNER B, BENGTSSON T, MOREIN B, PAULIE S, FOSSUM C (2018). A novel adjuvant G3 induces both Th1 and Th2 related immune responses in mice after immunization with a trivalent inactivated split-virion influenza vaccine. *Vaccine*. **36**(23): 3340–3344.
- HOGENESCH H, THOMPSON S, DUNHAM A, CEDDIA M, HAYEK M (2004). Effect of age on immune parameters and the immune response of dogs to vaccines: A cross-sectional study. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **97**: 77–85.
- HOLDER A, MIRCZUK SM (2018). Perturbation of the T cell receptor repertoire occurs with increasing age in dogs. *Dev. Comp. Immunol.*, **79**: 150–157.
- HOLDER A, MIRCZUK SM (2018). Perturbation of the T cell receptor repertoire occurs with increasing age in dogs. *Dev. Comp. Immunol.*, **79**: 150–157.
- HOLDER A, MIRCZUK SM (2018). Perturbation of the T cell receptor repertoire occurs with increasing age in dogs. *Dev. Comp. Immunol.*, **79**: 150–157.
- HONNEFFER JB, STEINER JM, LIDBURY JA, SUCHODOLSKI JS (2017). Variation of the microbiota and metabolome along the canine gastrointestinal tract. *Metabolomics*. **13**: 26.
- HOODA S, MINAMOTO Y, SUCHODOLSKI JS, SWANSON KS (2012). Current state of knowledge: the canine gastrointestinal microbiome. *Anim Health Res Rev.*, **13**(1): 78–88.
- HORIUCHI Y, NAKAJIMA Y, NARIAI Y, ASANUMA H, KUWABARA M, YUKAWA M (2007). Th1/Th2 balance in canine peripheral blood lymphocytes: A flow cytometric study. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **118**: 179–185.
- HORNBERG M, AROLT V, WILKE I, KRUSE A, KIRCHNER H (1995). Production of interferons and lymphokines in leukocyte cultures of patients with schizophrenia. *Schizophr. Res.*, **15**: 237 – 242.
- HOWREN MB, LAMKIN DM, SULS J (2009). Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: A meta-analysis. *Psychosom Med.*, **71**(2): 171-186.
- HSIAO EY, MCBRIDE SW, HSIEN S, SHARON G, HYDE ER, MCCUE T, CODELLI JA, CHOW J, REISMAN SE, PETROSINO JF, PATTERSON PH, MAZMANIAN SK (2013a). Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*, **155**(7): 1451-63.
- HSIAO EY, MCBRIDE SW, HSIEN S, SHARON G, HYDE ER, MCCUE T, CODELLI JA, CHOW J, REISMAN SE, PETROSINO JF, PATTERSON PH, MAZMANIAN SK (2013b). Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*, **155**(7): 1451-63.
- HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. **486**: 207–14.
- INSUA D, SUÁREZ ML, SANTAMARINA G, SARASA M, PESINI P (2010). Dogs with canine counterpart of Alzheimer's disease lose noradrenergic neurons. *Neurobiol. Aging.*, **31**: 625–635.
- ISAIHA A, PARAMBETH JC, STEINER JM, LIDBURY JA, SUCHODOLSKI JS (2017). The fecal microbiome of dogs with exocrine pancreatic insufficiency. *Anaerobe*, **45**: 50-58.

- ISRAELI E, AGMON-LEVIN N, BLANK M, SHOENFELD Y (2009). Adjuvants and autoimmunity. *Lupus*, **18**(13): 1217-25.
- IVANOV II, HONDA K (2012). Intestinal commensal microbes as immune modulators. *Cell Host Microbe*. **12**(4): 496–508.
- JEFFERY IB, LYNCH DB, O'TOOLE PW (2016). Composition and temporal stability of the gut microbiota in older persons. *ISME J.*, **10**: 170–82.
- JIMENEZ AG (2016). Physiological underpinnings in life-history trade-offs in man's most popular selection experiment: the dog. *J. Comp. Physiol. B.*, **186**: 813–827.
- JONES A, HEAD E, GREER KA (2018). Chapter 14 - The Dog as a Model for Aging Research, Conn's Handbook of Models for Human Aging (Second Edition), *Academic Press*, s: 167-176.
- JORGE S, DELLAGOSTIN OA (2017). The development of veterinary vaccines: A review of traditional methods and modern biotechnology approaches. *Biotechnol. Res. Innov.*, **1**: 6–13.
- KAMADA N, SEO SU, CHEN GY, NÚÑEZ G (2013). Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Rev. Immunol.*, **13**: 321–335.
- KAUFMAN GM (1984). Renal function in the geriatric dog. *Compend Contin. Educ. Pract. Vet.*, **6**: 108–109.
- KENNEDY LJ, LUNT M, BARNES A, MCELHINNEY L, FOOKS AR, BAXTER DN, OLLIER WE (2007). Factors influencing the antibody response of dogs vaccinated against rabies. *Vaccine*, **25**: 8500–8507.
- KHAN Z, COMBADIÈRE C, AUTHIER FJ, ITIER V, LUX F, EXLEY C, MAHROUF-YORGOV M, DECROUY X, MORETTO P, TILLEMENT O, GHERARDI RK, CADUSSEAU J (2013). Slow CCL2-dependent translocation of biopersistent particles from muscle to brain. *BMC Med.*, **11**: 99.
- KIHARA N, FUJIMURA M, YAMAMOTO I, ITOH E, INUI A, FUJIMIYA M (2001). Effects of central and peripheral urocortin on fed and fasted gastroduodenal motor activity in conscious rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **280**: 406–419.
- KIM HL, CHANG BJ, NAM SM, NAHM SS, LEE JH (2017). Increased osteopontin expression and mitochondrial swelling in 3-nitropropionic acid-injured rat brains. *Rom J Morphol Embryol.*, **58**: 1249–56.
- KIM Y K, KIM L, LEE MS (2000). Relationships between interleukins, neurotransmitters and psychopathology in drug-free male schizophrenics. *Schizophr. Res.*, **44**: 165 – 175.
- KIM Y K, MYINT AM, LEE BH, HAN CS, LEE HJ, KIM DJ, LEONARD BE (2004). Th1, Th2 and Th3 cytokine alteration in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.*, **28**:1129–1134.
- KIM YK, MAES M (2003). The role of cytokine network in psychological stress. *Acta Neuropsychiatr.*, **15**: 148 – 155
- KIRCHOFF NS, UDELL MAR, SHARPTON TJ (2019). The Gut Microbiome Correlates with Conspecific Aggression in a Small Population of Rescued Dogs (*Canis familiaris*). *PeerJ.*, **7**: 6103.
- KLINDWORTH A, PRUESSE E, SCHWEER T, PEPLIES J, QUAST C, HORN M, GLÖCKNER FO (2012). "Evaluation of General 16S Ribosomal RNA Gene PCR Primers for Classical and Next-Generation Sequencing-Based Diversity Studies." *Nucleic Acids Research*, **41** (1): e1–1.
- KOH A, DE VADDER F, KOVATCHEVA-DATCHARY P, BÄCKHED F (2016). From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell*. **165**(6): 1332–45.

- KOWALSKI K, MULAŁA A (2019). Brain-gut-microbiota axis in Alzheimer's disease. *J. Neurogastroenterol. Motil.*, **25**: 48–60.
- KUBERA M, LIN AH, KENIS G, BOSMANS E, VAN BOCKSTAELE D, MAES M (2001a). Anti-Inflammatory effects of antidepressants through suppression of the interferon-gamma/interleukin-10 production ratio. *J. Clin. Psychopharmacol.*, **21**: 199 – 206.
- KUBERA M, MAES M, HOLAN V, BASTA-KAŁM A, ROMAN A, SHANI J (2001b). Prolonged desipramine treatment increases the production of interleukin-10, an anti-inflammatory cytokine, in C57BL/6 mice subjected to the chronic mild stress model of depression. *J. Affect. Disord.*, **63**: 171 – 178
- KUBINYI E, RHALI SB, SÁNDOR S, SZABÓ A, FELFÖLDI T. (2020). Gut microbiome composition is associated with age and memory performance in pet dogs. *Animals*. **10**:1488.
- LANDSBERG G (2005). Therapeutic agents for the treatment of cognitive dysfunction syndrome in senior dogs. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, **29**(3): 471-479.
- LANDSBERG G, RUEHL W (1997). Geriatric behavioral problems. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, **27**: 1537–1559.
- LANDSBERG G, RUEHL W (1997). Geriatric behavioral problems. *Vet Clin N Am Small Anim Pract.*, **27**: 1537–1559.
- LANDSBERG GM, DENENBERG S, ARAUJO JA (2010). Cognitive dysfunction in cats. A syndrome we used to dismiss as “old age”. *J Feline Med Surg.*, **12**: 837–848.
- LANDSBERG GM, DEPORTER T, ARAUJO JA (2011). Clinical signs and management of anxiety, sleeplessness, and cognitive dysfunction in the senior pet. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, **41**(3): 565–90.
- LANDSBERG GM, MALAMED R (2017). Clinical Picture of Canine and Feline Cognitive Impairment. In *Canine and Feline Dementia: Molecular Basis, Diagnostics and Therapy*; Springer International Publishing: Cham, Switzerland.
- LANDSBERG GM, NICHOL J, ARAUJO JA (2012). Cognitive dysfunction syndrome. a disease of canine and feline brain aging. *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.*, **42**: 749–768.
- LANDSBERG GM, NICHOL J, ARAUJO JA (2012). Cognitive dysfunction syndrome a disease of canine and feline brain aging. *Veterinary Clin N Am-Small Animal Pract.*, **42**(4): 749–768.
- LAU JT, WHELAN FJ, HERATH I, LEE CH, COLLINS SM, BERCIK P, SURETTE MG (2016). Capturing the diversity of the human gut microbiota through culture-enriched molecular profiling. *Genome Med.*, **8**(1): 72.
- LAVELLE A, SOKOL H (2020). Gut Microbiota-Derived Metabolites as Key Actors in Inflammatory Bowel Disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **17**: 223–237.
- LAWLER DF, BALLAM JM, MEADOWS R (2007). Influence of lifetime food restriction on physiological variables in Labrador Retriever dogs. *Exp Gerontol.*, **42**: 204–214.
- LECUYER E, RAKOTOBE S, LENGLINE-GARNIER H, LEBRETON C, PICARD M, JUSTE C, FRITZEN R, EBERL G, MCCOY KD, MACPHERSON AJ, REYNAUD CA, CERF-BENSUSSAN N, GABORIAU-ROUTHIAU V (2014). Segmented filamentous bacterium uses secondary and tertiary lymphoid tissues to induce gut IgA and specific T helper 17 cell responses. *Immunity*. **40**(4): 608–20.
- LI J, WANG J, WANG M, ZHENG L, CEN Q, WANG F, ZHU L, PANG R, ZHANG A (2023). Bifidobacterium: a probiotic for the prevention and treatment of depression. *Front Microbiol.*, **14**: 1174800.

- LI X, ALDAYEL AM, CUI Z (2014). Aluminum hydroxide nanoparticles show a stronger vaccine adjuvant activity than traditional aluminum hydroxide microparticles. *Journal of Controlled Release*. **173**(1): 148-157.
- LINDBLAD-TOH K, WADE CM, MIKKELSEN TS, KARLSSON EK, JAFFE DB, KAMAL M, CLAMP M, CHANG JL, KULBOKAS EJ, ZODY MC, MAUCELI E, XIAOHUI X, BREEN M, WAYNE RK, OSTRANDER EA, PONTING CP, GALIBERT F, SMITH DR, DELONG PJ, KIRKNESS E, ALVAREZ P, BIAGI T, BROCKMAN W, BUTLER J, CHIN CW, COOK A, CUFF J, DALY MJ, DECAPRIO D, GNERRE S, GRABHERR M, KELLIS M, KLEBER M, BARDELEBEN C, GOODSTADT L, HEGER A, HITTE C, KIM L, KOEPFLI KP, PARKER HG, POLLINGER JP, SEARLE SMJ, SUTTER NB, THOMAS R, WEBBER C, LANDER ES (2005). Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*, **438**: 803–819.
- LITSTER A, NICHOLS J, VOLPE A (2012). Prevalence of positive antibody test results for canine parvovirus (CPV) and canine distemper virus (CDV) and response to modified live vaccination against CPV and CDV in dogs entering animal shelters. *Veterinary Microbiology*. **157**: 86-90.
- LOUIS P, FLINT HJ (2009). Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett.*, **294**:1–8.
- LOUIS P, FLINT HJ (2017). Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol.*, **19**:29–41.
- LUJÁN L, PÉREZ M, SALAZAR E, ÁLVAREZ N, GIMENO M, PINCZOWSKI P, IRUSTA S, SANTAMARÍA J, INSAUSTI N, CORTÉS Y, FIGUERAS L, CUARTIELLES I, VILA M, FANTOVA E, CHAPULLÉ JL (2013). Autoimmune/autoinflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA syndrome) in commercial sheep. *Immunol Res.*, **56**(2-3): 317-24.
- LYNN DJ, PULENDRAN B (2018). The potential of the microbiota to influence vaccine responses. *J Leukocyte Biol.*, **103**: 225–231.
- LYU Y, SU C, VERBRUGGHE A, VAN DE WIELE T, MARTOS MARTINEZ-CAJA A, HESTA M (2020). Past, present, and future of gastrointestinal microbiota research in cats. *Front Microbiol.*, **11**: 1661.
- MADARIĀ A, FARBAKOVA J, KATĪNA S, SMOLEK T, NOVAK P, WEĪSSOVA T, NOVAK M, ZĪLKA N (2015). Assessment of severity and progression of canine cognitive dysfunction syndrome using the CANine DEmentia Scale (CADES). *Appl Animal Behav Sci.*, **171**: 138–145.
- MAEDA Y, KURAKAWA T, UMEMOTO E, MOTOOKA D, ITO Y, GOTOH K, HIROTA K, MATSUSHITA M, FURUTA Y, NARAZAKI M, SAKAGUCHI N, KAYAMA H, NAKAMURA S, IIDA T, SAEKI Y, KUMANOGOH A, SAKAGUCHI S, TAKEDA K (2016). Dysbiosis Contributes to Arthritis Development via Activation of Autoreactive T Cells in the Intestine. *Arthritis Rheumatol.*, **68**(11): 2646-2661.
- MAEDA Y, TAKEDA K (2017). Role of Gut Microbiota in Rheumatoid Arthritis. *J. Clin. Med.*, **6**: 60.
- MAES M, SCHARPÉ S, MELTZER HY, OKAYLI G, BOSMANS E, D'HONDT P, VANDEN BOSSCHE BV, COSYNS P (1994). Increased neopterin and interferon-gamma secretion and lower availability of L-tryptophan in major depression: further evidence for an immune response. *Psychiatry Res.*, **54**(2): 143-60.
- MAKKĪ K, DEEHAN E C, WALTER J, BÄCKHED F (2018). The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. *Cell Host Microbe*. **23**(6): 705–15.
- MANCHESTER AC, WEBB CB, BLAKE AB, SARWAR F, LĪDBURY JA, STEĪNER JM, SUCHODOLSKĪ JS (2019). Long-term impact of tylosin on fecal microbiota and fecal bile acids of healthy dogs. *J Vet Intern Med.*, **33**: 2605-2617.

- MARCHIORO SB, MAES D, FLAHOUB, PASMANS F, DEL POZO SACRISTÁN R, VRANCKX K, MELKEBEEK V, COX E, WUYTS N, HAESBROUCK F (2013). Local and systemic immune responses in pigs intramuscularly injected with an inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine. *Vaccine*. **31**(9): 1305-1311.
- MARIA APJ, AYANE L, PUTAROV TC, LOUREIRO BA, NETO BP, CASAGRANDE MF, GOMES MOS, GLÓRIA MBA, CARCIOFI AC (2017). The effect of age and carbohydrate and protein sources on digestibility, fecal microbiota, fermentation products, fecal IgA, and immunological blood parameters in dogs. *J Anim Sci.*, **95**(6): 2452-2466.
- MARTIN CR, OSADCHIY V, KALANI A, MAYER EA (2018). The brain–gut–microbiome axis. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, **6**: 133–148.
- MARTIN SB, DOWLING ALS, HEAD E (2011). Therapeutic interventions targeting β amyloid pathogenesis in an aging dog model. *Curr. Neuropharmacol.*, **9**: 651–661.
- MASUOKA H, SHIMADA K, KIYOSUE-YASUDA T, KIYOSUE M, OISHI Y, KIMURA S, YAMADA A, HIRAYAMA K (2017). Transition of the intestinal microbiota of dogs with age. *Biosci Microbiota Food Health.*, **36**: 27–31.
- MAUDERLY JL (1979). Effect of age on pulmonary structure and function of immature and adult animals and man. *Fed Proc.*, **38**: 173–177.
- MAYER EA, TILLISCH K (2011). The brain-gut axis in abdominal pain syndromes. *Annu Rev Med.*, **62**: 381–396.
- MC KENZIE BA, CHEN FL, GRUEN ME, OLBY NJ (2022). Canine geriatric syndrome: a framework for advancing research in veterinary geroscience. *Front Vet Sci.*, **9**: 853743.
- MCDONALD D, HYDE E, DEBELIUS JW, MORTON JT, GONZALEZ A, ACKERMANN G, AKSENOV AA, BEHSAZ B, BRENNAN C, CHEN Y, DERIGHT GOLDASICH L, DORRESTEIN PC, DUNN RR, FAHIMIPOUR AK, GAFFNEY J, GILBERT JA, GOGUL G, GREEN JL, HUGENHOLTZ P, HUMPHREY G, HUTTENHOWER C, JACKSON MA, JANSSEN S, JESTE DV, JIANG L, KELLEY ST, KNIGHTS D, KOSCIOLEK T, LADAU J, LEACH J, MAROTZ C, MELESHKO D, MELNIK AV, METCALF JL, MOHIMANI H, MONTASSIER E, NAVAS-MOLINA J, NGUYEN TT, PEDDADA S, PEVZNER P, POLLARD KS, RAHNAVARD G, ROBBINS-PIANKA A, SANGWAN N, SHORENSTEIN J, SMARR L, SONG SJ, SPECTOR T, SWAFFORD AD, THACKRAY VG, THOMPSON LR, TRIPATHI A, VÁZQUEZ-BAEZA Y, VRBANAC A, WISCHMEYER P, WOLFE E, ZHU Q; AMERICAN GUT CONSORTIUM; KNIGHT R (2018). American Gut: an Open Platform for Citizen Science Microbiome Research. *mSystems*. **3**(3): e00031-18.
- MCKEE AS, MUNKS MW, MACLEOD MK, FLEENOR CJ, VAN ROOIJEN N, KAPPLER JW, MARRACK P (2009). Alum induces innate immune responses through macrophage and mast cell sensors, but these sensors are not required for alum to act as an adjuvant for specific immunity. *J Immunol.*, **183**(7): 4403-14.
- MCMILLAN FD (2003). Maximizing quality of life in III animals. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, **39**: 227–235.
- MCVEY S, SHI J (2010). Vaccines in veterinary medicine: A brief review of history and technology. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice*. **40**(3): 381-392.
- MECH LD (2006). Estimated age structure of wolves in Northeastern Minnesota. *J. Wildl. Manage.*, **70**: 1481–1483.
- MEEUSEN EN, WALKER J, PETERS A, PASTORET PP, JUNGENSEN G (2007). Current status of veterinary vaccines. *Clin. Microbiol. Rev.*, **20**: 489–510.
- MELLENDEZ L, SANTOS D, LUNA POLIDO L, MENDES ML, SELLA S, CALDAS LQ, SILVE-FILHO E (2013). Aluminium and other metals may pose a risk to children with autism spectrum disorder: biochemical and behavioural impairments. *Clin Exp Pharmacol.*, **3**: 1.

- MENKE S, MEIER M, MFUNE JKE, MELZHEIMER J, WACHTER B, SOMMER S (2017). Effects of host traits and land-use changes on the gut microbiota of the Namibian black-backed jackal (*Canis mesomelas*). *FEMS Microbiol Ecol.*, **93**:fix123.
- MENTULA S, HARMOINEN J, HEIKKILÄ M, WESTERMARCK E, RAUTIO M, HUOVINEN P, KÖNÖNEN E (2005). Comparison between cultured small-intestinal and fecal microbiotas in beagle dogs. *Appl Environ Microbiol.*, **71**: 4169–75.
- MICHELL AR (1999). Longevity of British breeds of dog and its relationships with sex, size, cardiovascular variables and disease. *Vet. Rec.*, **145**: 625–629.
- MIDDELBOS IS, VESTER BOLER BM, QU A, WHITE BA, SWANSON KS, FAHEY GC Jr (2010). Phylogenetic characterization of fecal microbial communities of dogs fed diets with or without supplemental dietary fiber using 454 pyrosequencing. *PLoS One*, **5**(3): e9768.
- MIKLÓSI Á (2014). Dog behaviour, evolution, and cognition. (Oxford: Oxford University Press).
- MIKLÓSI Á, KUBINYI E (2016). Current trends in canine problem-solving and cognition. *Curr. Dir. Psychol. Sci.*, **25**: 300–306.
- MILA H, FEUGIER A, GRELLET A, ANNÉ J, GONNIER M, MARTIN M, ROSSIG L, CHASTANT-MAILLARD S (2015). Immunoglobulin G concentration in canine colostrum: Evaluation and variability. *J. Reprod. Immunol.*, **112**: 24–28.
- MILANI C, MANGIFESTA M, MANCABELLI L, LUGLI GA, JAMES K, DURANTI S, TURRONI F, FERRARIO C, OSSIPRANDI MC, VAN SINDEREN D, VENTURA M (2017). Unveiling bifidobacterial biogeography across the mammalian branch of the tree of life. *ISME J.*, **11**: 2834–2847.
- MILES AP, MCCLELLAN HA, RAUSCH KM, ZHU D, WHITMORE MD, SINGH S, MARTIN LB, WU Y, GIERSSING BK, STOWERS AW, LONG CA, SAUL A (2005). Montanide® ISA 720 vaccines: Quality control of emulsions, stability of formulated antigens, and comparative immunogenicity of vaccine formulations. *Vaccine*. **23**(19): 2528-2537.
- MILGRAM NW, HEAD E, WEINER E, THOMAS E (1994). Cognitive functions and aging in the dog: Acquisition of nonspatial visual tasks. *Behavioral Neuroscience*. **108**(1): 57–68.
- MINAMOTO Y, MINAMOTO T, ISAAH A, SATTASATHUCHANA P, BUONO A, RANGACHARI VR, MCNEELY IH, LIDBURY J, STEINER JM, SUCHODOLSKI JS (2019). Fecal Short-Chain Fatty Acid Concentrations and Dysbiosis in Dogs with Chronic Enteropathy. *J. Vet. Intern. Med.*, **33**: 1608–1618.
- MINAMOTO Y, OTONI CC, STEELMAN SM, BÜYÜKLEBLEBICI O, STEINER JM, JERGENSE AE, SUCHODOLSKI JS (2015). Alteration of the fecal microbiota and serum metabolite profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Gut Microbes*, **6**: 33–47.
- MITCHELL SA, ZWIJNENBERG RJ, HUANG J, HODGE A, DAY MJ (2012). Duration of serological response to canine parvovirus-type 2, canine distemper virus, canine adenovirus-type 1 and canine parainfluenza virus in client-owned dogs in Australia. *Australian Veterinary Journal*. **90**: 468-473.
- MIZUKAMI K, UCHIYAMA J, IGARASHI H, MURAKAMI H, OSUMI T, SHIMA A, ISHIAHRA G, NASUKAWA T, UNE Y, SAKAGUCHI M (2019). Age-related analysis of the gut microbiome in a purebred dog colony. *FEMS Microbiol. Lett.*, **366**: 8.
- MOLD M, UMAR D, KING A (2018). Aluminium in brain tissue in autism. *J Trace Med Biol.*, **46**: 76-82.
- MONGILLO P, ARAUJO JA, PITTERI E, CARNIER P, ADAMELLI S, REGOLIN L, MARINELLI L (2013). Spatial reversal learning is impaired by age in pet dogs. *Age*, **35**: 2273–2282.
- MORAIS LH, SCHREIBER HL, MAZMANIAN SK (2021). The gut microbiota-brain axis in behaviour and brain disorders. *Nat Rev Microbiol.*, **19**(4): 241-255.

- MORRIS G, BERK M, CARVALHO A, CASO JR, SANZ Y, WALDER K, MAES M (2017). The Role of the Microbial Metabolites Including Tryptophan Catabolites and Short Chain Fatty Acids in the Pathophysiology of Immune-Inflammatory and Neuroimmune Disease. *Mol Neurobiol.*, **54**(6): 4432-4451.
- MOSCA F, TRITTO E, MUZZI A, MONACI E, BAGNOLI F, IAVARONE C, O'HAGAN D, RAPPUOLI R, DE GREGORIO E (2008). Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **105**(30): 10501–6.
- MOUZIN DE, LORENZEN MJ, HAWORTH JD, KING VL (2004). Duration of serologic response to five viral antigens in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **224**: 55–60.
- MOUZIN DE, LORENZEN MJ, HAWORTH JD, KING VL (2004). Duration of serologic response to five viral antigens in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* **224**: 55-60.
- MULAK A, BONAZ B (2004). Irritable bowel syndrome: a model of the brain-gut interactions. *Med Sci Monit.*, **10**: 55–62.
- MULER GH, KIRK RW, SCOTT DW (1983). Small animal dermatology. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Co.
- MYINT AM, LEONARD BE, STEINBUSCH HW, KIM YK (2005). Th1, Th2, and Th3 cytokine alterations in major depression. *J. Affect. Disord.*, **88**: 167-173
- MYINT H, IWAHASHI Y, KOIKE S, KOBAYASHI Y (2017). Effect of soybean husk supplementation on the fecal fermentation metabolites and microbiota of dogs. *Anim Sci J.*, **88**(11): 1730–6.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (2006). Nutrient requirements of dogs and cats. Washington, DC. National Academies Press.
- NEILSON J C, HART B L, CLIFF K D, RUEHL W W (2001). Prevalence of behavioral changes associated with age-related cognitive impairment in dogs. *J Am Veterinary Med Assoc.*, **218**(11): 1787–1791.
- NEILSON JC, HART BL, CLIFF KD, RUEHL WW (2001). Prevalence of behavioral changes associated with age-related cognitive impairment in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **218**: 1787–1791.
- NELSON RW, COUTO CG (2009). Small Animal Internal Medicine. 2nd ed. Mosby; St. Louis, MO, USA. s. 892.
- NEUFELD KAM, KANG N, BIENENSTOCK J, FOSTER JA (2011). Effects of intestinal microbiota on anxiety-like behavior. *Commun Integr Biol.*, **4**: 492-494.
- NEWMAN MJ, WU JY, GARDNER BH, MUNROE KJ, LEOMBRUNO D, RECCHIA J, KENSIL C R, COUGHLIN RT (1992). Saponin adjuvant induction of ovalbumin-specific CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Immun.*, **148**: 2357-2362.
- O'CALLAGHAN A, VAN SINDEREN D (2016). Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota. *Front. Microbiol.*, **7**: 925.
- O'NEILL DG, CHURCH DB, MCGREEVY PD, THOMSON PC, BRODBELT DC (2013). Longevity and mortality of owned dogs in England. *Vet. J.*, **198**: 638–643.
- O'TOOLE PW, JEFFERY IB (2015). Gut microbiota and aging. *Sci Am Assoc Adv Sci.*, **350**: 1214–5.
- ODAMAKI T, KATO K, SUGAHARA H, HASHIKURA N, TAKAHASHI S, XIAO J, ABE F, OSAWA R (2016). Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol.*, **16**: 90.

- OFFIT PA, JEW RK (2003). Addressing parents' concerns: do vaccines contain harmful preservatives, adjuvants, additives, or residuals?. *Pediatrics*, **112**(6-1): 1394–7.
- OKSANEN J, SIMPSON GL, BLANCHET FG, KINDT R, LEGENDRE P, MINCHIN PR, O'HARA RB, SOLYMOS P, STEVENS MHH, SZOEC S, WAGNER H, BARBOUR M, BEDWARD M, BOLKER B, BORCARD D, CARVALHO G, CHIRICO M, CACERES MD, DURAND S, EVANGELISTA HBA, FITZJOHN R, FRIENDLY M, FURNEAUX B, HANNIGAN G, HILL MO, LAHTI L, MCGLINN D, OUELLETTE MH, CUNHA ER, SMITH T, STIER A, TER BRAAK C, WEEDON J (2019). Vegan: Community Ecology Package.
- OMATSU T, OMURA M, KATAYAMA Y, KIMURA T, OKUMURA M, OKUMURA A, MURATA Y, MIZUTANI T (2018). Molecular diversity of the faecal microbiota of Toy Poodles in Japan. *J Vet Med Sci.*, **80**: 749–54.
- OSELLA MC, RE G, ODORE R, GIRARDI C, BADINO P, BARBERO R, BERGAMASCO L (2007). Canine cognitive dysfunction syndrome: prevalence, clinical signs and treatment with a neuroprotective nutraceutical. *Appl Animal Behav Sci.*, **105**(4): 297–310.
- OTT G, RADHAKRISHNAN R, FANG J, HORA H (2000). The adjuvant MF59: A 10-year perspective. *Vaccine Adjuvants*. **42**: 211-228.
- OUCHI N, PARKER J L, LUGUS J J, WALSH K (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.*, **11**: 85–97.
- OWEN BM, ECCLESTON D, FERRIER IN, YOUNG AH (2001). Raised levels of plasma interleukin-1beta in major and postviral depression. *Acta Psychiatr Scand.*, **103**(3): 226-8.
- PALMQVIST H, RINGMARK S, HÖGLUND K, PELVE E, LUNDH T, DICKSVED J (2022). Effects of rye inclusion in dog food on fecal microbiota and short-chain fatty acids. *BMC Veterinary Research*. **19**(70).
- PARADA VENEGAS D, DE LA FUENTE MK, LANDSKRON G, GONZALES MJ, QUERA R, DIJKSTRA G, HARMSSEN HJ, FABER KN, HERMOSO MA (2019). Short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel Diseases. *Front Immunol.*, **10**: 277.
- PASHINE A, VALIANTE N M, ULMER JB (2005). Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nat Med.*, **11**: 63-8.
- PATRONEK GJ, WATERS DJ, GLICKMAN LT (1997). Comparative longevity of pet dogs and humans: implications for gerontology research. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **52**: 171–178.
- PAUL M A, APPEL M, BARRETT R, CARMICHAEL LE, CHILDERS H, COTTER S, DAVIDSON A, FORD R, KEIL D, LAPPIN M, SHULTZ RD, THACKER E, TRUMPETER JL, WELBORN L (2003). Report of the American Animal Hospital Association (AAHA) Canine task force: Executive Summary and 2003 Canine Vaccine Guidelines and Recommendations. *Journal of the American Animal Hospital Association*. **39**(2): 119-31.
- PEREIRA AM, PINNA C, BIAGI G, STEFANELLI C, MAIA MRG, MATOS E, SEGUNDA MA, FONSECA AJ, CABRITA AR (2020). Supplemental selenium source on gut health: insights on fecal microbiome and fermentation products of growing puppies. *FEMS Microbiol Ecol.*, **96**: fiae212.
- PEREIRA M, VALÉRIO-BOLAS A, SARAIVA-MARQUES C, ALEXANDRE-PIRES G, PEREIRA DA FONSECA I, SANTOS-GOMES G (2019). Development of Dog Immune System: From in Uterus to Elderly. *Vet Sci.*, **6**(4):83.
- PEREIRA M, VALÉRIO-BOLAS A, SARAIVA-MARQUES C, ALEXANDRE-PIRES G, PEREIRA DA FONSECA I, SANTOS-GOMES G (2019). Development of dog immune system: from in uterus to elderly. *Vet Sci.*, **6** (4): 83.

- PERLMAN RL (2016). Mouse models of human disease: An evolutionary perspective. *Evol Med Public Health.*, **1**: 170-6.
- PETER K, MEN Y, PANTALEO G, GANDER B, CORRADIN G (2001). Induction of a cytotoxic T-cell response to HIV-1 proteins with short synthetic peptides and human compatible adjuvants. *Vaccine.* **19**(30): 4121-4129.
- PETRIK MS, WONG MC, TABATA RC, GARRY RF, SHAW CA (2007). Aluminum adjuvant linked to Gulf War illness induces motor neuron death in mice. *Neuromolecular Med.*, **9**(1): 83-100.
- PIANTA A, ARVIKAR S, STRLE K, DROUIN EE, WANG Q, COSTELLO CE, STEERE AC (2017). Evidence of the immune relevance of *Prevotella copri*, a gut microbe, in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.*, **69**: 964–975.
- PILLA R, GASCHEN FP, BARR JW, OLSON E, HONNEFFER J, GUARD BC, BLAKE AB, VILLANUEVA D, KHATTAB MR, ALSHAWAQFEH MK, LIDBURY JA, STEINER JM, SUCHODOLSKI JS (2020). Effects of metronidazole on the fecal microbiome and metabolome in healthy dogs. *J Vet Intern Med.*, **34**(5): 1853-1866.
- PILLA R, GASCHEN FP, BARR JW, OLSON E, HONNEFFER J, GUARD BC, BLAKE AB, VILLANUEVA D, KHATTAB M, ALSHAWAQFEH MK, LIDBURY A, STEINER JM, SUCHODOLSKI JS (2020). Effects of metronidazole on the fecal microbiome and metabolome in healthy dogs. *J. Vet. Intern. Med.*, **34**: 1853–1866
- PILLA R, SUCHODOLSKI JS (2020). The role of the canine gut microbiome and metabolome in health and gastrointestinal disease. *Front. Vet. Sci.*, **6**: 498.
- POFFENBARGER EM, OLSON PN, CHANDLER ML, SEIM HB, VARMAN M (1991). Use of adult dog serum as a substitute for colostrum in the neonatal dog. *Am. J. Vet. Res.*, **52**: 1221–1224.
- POTRYKUS J, WHITE RL, BEARNE SL (2008). Proteomic investigation of amino acid catabolism in the indigenous gut anaerobe *Fusobacterium varium*. *Proteomics.* **8**: 2691–703.
- POWELL N, WALKER MM, TALLEY NJ (2017). The mucosal immune system: master regulator of bidirectional gut-brain communications. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **14**: 143–159.
- QUAST C, PRUESSE E, YILMAZ P, GERKEN J, SCHWEER T, YARZA P, PEPLIES J, GLÖCKNER FO (2013). “The SILVA Ribosomal RNA Gene Database Project: Improved Data Processing and Web-Based Tools.” *Nucleic Acids Res.*, **41**: D590–6.
- RAJAPAKSHA E (2018). Special considerations for diagnosing behavior problems in older pets. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, **48**(3): 443–56.
- RAMON G (1924). Sur la toxine et sur l’anatoxine diphtériques. *Ann. Inst. Pasteur.*, **38**: 1–10.
- RAPLY M (2003). Quality of Life Research—A Critical Introduction. SAGE Publications; Thousand Oaks, CA, USA.
- RAVUSSIN Y, KOREN O, SPOR A, LEDUC C, GUTMAN R, STOMBAUGH J, KNIGHT R, LEY RE, LEIBEL RL (2012). Responses of gut microbiota to diet composition and weight loss in lean and obese mice. *Obesity (Silver Spring)*, **20**(4): 738-47.
- REID J, NOLAN AM, SCOTT EM (2018). Measuring pain in dogs and cats using structured behavioural observation. *Vet. J.*, **236**: 72–79.
- REUL JM, ROTHUIZEN J, DE KLOET ER (1991). Age-related changes in the dog hypothalamic-pituitary-adrenocortical system: neuroendocrine activity and corticosteroid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, **40**: 63–69.
- REYNOLDS H Y, JOHNSON J S (1970). Quantitation of canine immunoglobulins. *J. Immunol.*, **105**: 698–703.

- RICKS J, ROBERTS M, PATTERSON R (1970). Canine secretory immunoglobulins: Identification of secretory component. *J. Immunol.*, **105**: 1327–1333.
- RITCHIE LE, BURKE KF, GARCIA-MAZCORRO JF, STEINER JM, SUCHODOLSKI JS (2010). Characterization of fecal microbiota in cats using universal 16S rRNA gene and group-specific primers for *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. *Vet Microbiol.*, **144**(1-2): 140-6.
- RITCHIE LE, STEINER JM, SUCHODOLSKI JS (2008). Assessment of microbial diversity along the feline intestinal tract using 16S rRNA gene analysis. *FEMS Microbiol Ecol.*, **66**: 590-598.
- RIVIÈRE A, SELAK M, LANTIN D, LEROY F, DE VUYST L (2016). Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Front Microbiol.*, **7**: 979.
- RIZZI C, BIANCO M V, BLANCO FC, SORIA M, GRAVISACO MJ, MONTENEGRO V, VAGNONI L, BUDDLE B, GARBACCIO S, DELGADO F, LEAL KS, CATALDI AA, DELLAGOSTIN OA (2012). Vaccination with a BCG strain overexpressing Ag85B protects cattle against *Mycobacterium bovis* challenge. *PLoS One*. **7**(12): e51396.
- ROSATO E, SALSANO F (2008). Immunity, autoimmunity and autoimmune diseases in older people. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.*, **22**: 217–224.
- ROTH G, DICKE U (2005). Evolution of the brain and intelligence. *Trends Cogn. Sci.*, **9**: 250–257.
- ROTH JA (1999). Mechanistic bases for adverse vaccine reactions and vaccine failures. *Advances in Veterinary Medicine*. **41**: 681.
- ROUDEBUSH P, ZICKER SC, COTMAN CW, MILGRAM NW, MUGGENBURG BA, HEAD E (2005). Nutritional management of brain aging in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **227**: 722–728.
- ROWLAND I, GIBSON G, HEINKEN A, SCOTT K, SWANN J, THIELE I, TUOHY K (2018). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr.*, **57**: 1-24.
- RUEHL WW, BRUYETTE DS, DE PAOLI A, COTMAN CW, HEAD E, MILGRAM NW, CUMMINGS BJ (1995). Canine cognitive dysfunction as a model for human age-related cognitive decline, dementia and Alzheimer's disease: clinical presentation, cognitive testing, pathology and response to 1-deprenyl therapy. *Curr Neurochem Pharmacol Aspects of Biogenic Amines.*, **106**: 217–225.
- RUPLE A, MACLEAN E, SNYDER-MACKLER N, CREEVY KE, PROMISLOW D (2022). Dog Models of Aging. *Annu Rev Anim Biosci.*, **10**: 419-439.
- SALGIRLI DEMIRBAS Y, ISPARTA S, SARAL B, KESKIN YILMAZ N, ADIAY D, MATSUI H, TÖRE-YARGIN G, MUSA SA, ATILGAN D, ÖZTÜRK H, KUL BC (2023). Acute and chronic stress alter behavioral laterality in dogs. *Scientific Reports*, **13**(1): 4092.
- SALVIN HE, MC GREEVY PD, SACHDEV PS, VALENZUELA MJ (2011). The canine cognitive dysfunction rating scale (CCDR): a data-driven and ecologically relevant assessment tool. *Veterinary J.*, **188**: 331–336.
- SAMPSON TR, MAZMANIAN SK (2015). Control of brain development, function, and behavior by the microbiome. *Cell Host Microbe*. **17**: 565–576.
- SÁNDOR S, KUBINYI E (2019). Genetic Pathways of Aging and Their Relevance in the Dog as a Natural Model of Human Aging. *Front Genet.*, **10**: 948.
- SANDRI M, DAL MONEGO S, CONTE G, SGORLON S, STEFANON B (2017). Raw meat based diet influences faecal microbiome and end products of fermentation in healthy dogs. *BMC Vet Res.*, **13**: 65.
- SCHÄFER-SOMI S, BÄR-SCHADLER S, AURICH JE (2005). Immunoglobulins in nasal secretions of dog puppies from birth to six weeks of age. *Res. Vet. Sci.*, **78**: 143-150

- SCHÄFER-SOMI S, BÄR-SCHADLER S, AURICH JE (2005). Immunoglobulins in nasal secretions of dog puppies from birth to six weeks of age. *Res. Vet. Sci.*, **78**: 143–150.
- SCHÄFER-SOMI S, BÄR-SCHADLER S, AURICH JE (2016). Canine colostrum. *In: Veterinary Focus*. **26**(1).
- SCHER JU, SCZESNAK A, LONGMAN RS, SEGATA N, UBEDA C, BIELSKI C, ROSTRON T, CERUNDOLO V, PAMER EG, ABRAMSON SB, HUTTENHOWER C, LITTMAN DR (2013). Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *ELife*, **2**: e01202.
- SCHMIDT F, BOLTZE J, JÄGER C, HOFMANN S, WILLEMS N, SEEGER J, HARTIG W, STOLZING A (2015). Detection and quantification of β -amyloid, pyroglutamyl A β , and tau in aged canines. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **74**: 912–923.
- SCHMIDT M, UNTERER S, SUCHODOLSKI JS, HONNEFFER JB, GUARD BC, LIDBURY JA, STEINER JM, FRITZ J, KÖLLE P (2018). The fecal microbiome and metabolome differs between dogs fed Bones and Raw Food (BARF) diets and dogs fed commercial diets. *PLoS ONE*. **13**: e0201279.
- SCHOENEBECK JJ, OSTRANDER EA (2014). Insights into morphology and disease from the dog genome project. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **30**: 535–560.
- SCHROEDER FA, LIN CL, CRUSIO WE, AKBARIAN S (2007). Antidepressant-like effects of the histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, in the mouse. *Biol. Psychiatry*, **62**: 55–64.
- SCHULTZ R, THIEL B, MUKHTAR E, SHARP P, LARSON L (2010). Age and long-term protective immunity in dogs and cats. *J. Comp. Pathol.*, **142**: 102–108.
- SCHULTZ RD (2006). Duration of immunity for canine and feline vaccines: a review. *Veterinary Microbiology*. **117**: 75–79.
- SENEFF S, DAVIDSON RM, LIU J (2012). Empirical data confirm autism symptoms related to aluminum and acetaminophen exposure. *Entropy*. **14**: 2227–53.
- SHAKYA M, LO CC, CHAIN PSG (2019). Advances and challenges in metatranscriptomic analysis. *Front Genet.*, **10**: 904.
- SHANAN A (2011). A veterinarian's role in helping pet owners with decision making. *Vet. Clin. Small Anim. Pract.*, **41**: 635–646.
- SHAW CA, PETRIK MS (2009). Aluminum hydroxide injections lead to motor deficits and motor neuron degeneration. *J Inorg Biochem.*, **103**(11): 1555–62.
- SHEPHERD A, ZHANG TD, ZELEZNIKOW-JOHNSTON AM, HANNAN AJ, BURROWS EL (2018). Transgenic mouse models as tools for understanding how increased cognitive and physical stimulation can improve cognition in Alzheimer's disease. *Brain Plast.*, **4**: 127–150.
- SHERWIN E, DINAN TG, CRYAN JF (2018). Recent developments in understanding the role of the gut microbiota in brain health and disease. *Ann NY Acad Sci.*, **1420**: 5–25.
- SHIMOJI Y, OISHI E, KITAJIMA T, MUNETA Y, SHIMIZU S, MORI Y (2002). Erysipelothrix rhusiopathiae YS-1 as a live vaccine vehicle for heterologous protein expression and intranasal immunization of pigs. *Infection and Immunity*. **70**(1): 226–232.
- SILVA P, BERNARDI A, FROZZA R L (2020). The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **11**: 25.
- Simpson EH (1949). "Measurement of Diversity." *Nature*, **163** (4148): 688–88.
- SMOLEK T, MADARI A, FARBAKOVA J, KANDRAC O, JADHAV S, CENTE M, BREZOVAKOVA V, NOVAK M, ZILKA N (2016). Tau hyperphosphorylation in

- synaptosomes and neuroinflammation are associated with canine cognitive impairment. *J. Comp. Neurol.*, **524**: 874–895.
- Spellerberg IF, Fedor (2003). “A Tribute to Claude Shannon (1916-2001) and a Plea for More Rigorous Use of Species Richness, Species Diversity and the ‘Shannon-Wiener’ Index.” *Global Ecology and Biogeography*, **12**(3):177-179.
- SPOFFORD N, LEFEBVRE S L, MCCUNE S, NIEL L (2013). Should the veterinary profession invest in developing methods to assess quality of life in healthy dogs and cats? *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **243**: 952–956.
- STEWART L, MACLEAN EL, IVY D, WOODS V, COHEN E, RODRIGUEZ K, MCINTYRE M, MUKHERJEE S, CALL J, KAMINSKI J, MIKLÓSI Á, WRANGHAM RW, HARE B (2015). Citizen Science as a New Tool in Dog Cognition Research. *PLoS One*, **10**(9): e0135176.
- STOFFEL MH, FRIESS AE, HARTMANN SH (2000). Ultrastructural evidence of transplacental transport of immunoglobulin G in bitches. *Reproduction*. **118**: 315–326.
- STRANDWITZ P, KIM KH, TEREKHOVA D, LIU JK, SHARMA A, LEVERING J, MCDONALD D, DIETRICH D, RAMADHAR TR, LEKBUA A, MROUE N, LISTON C, STEWART EJ, DUBIN MJ, ZENGLER K, KNIGHT R, GILBERT JA, CLARDY J, LEWIS K (2019). GABA-modulating bacteria of the human gut microbiota. *Nat Microbiol.*, **4**(3): 396-403.
- STRASSER A, MAY B, TELTSCHER A, WISTRELA E, NIEDERMÜLLER H (2003). Immune modulation following immunization with polyvalent vaccines in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **94**(3-4): 113-121.
- STRASSER A, TELTSCHER A, SANDERS C, NIEDERMÜLLER H, MAY B (2000). Age-associated Changes in the Immune System of German Shepherd Dogs. *J. Vet. Med. Ser., A*, **47**: 181–192.
- STUDZIŃSKI CM, CHRISTIE LA, ARAUJO JA, BURNHAM WM, HEAD E, COTMAN CW, MILGRAM NW (2006). Visuospatial function in the beagle dog: an early marker of cognitive decline in a model of human aging and dementia. *Neurobiol Learning Memory.*, **86**(2): 197–204.
- SUCHODOLSKI JS (2011). Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, **41**(2): 261-72.
- SUCHODOLSKI JS (2022). Analysis of the gut microbiome in dogs and cats. *Vet Clin Pathol.*, **1**: 6-17.
- SUCHODOLSKI JS, CAMACHO J, STEINER JM (2008). Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. *FEMS Microbiol Ecol.*, **66**: 567-578.
- SUCHODOLSKI JS, DOWD SE, WESTERMARCK E, STEINER JM, WOLCOTT RD, SPILLMANN T, HARMOINEN JA (2009). The effect of the macrolide antibiotic tylosin on microbial diversity in the canine small intestine as demonstrated by massive parallel 16S rRNA gene sequencing. *BMC Microbiol.*, **9**: 210.
- SUCHODOLSKI JS, MARKEL ME, GARCÍA-MAZCORRO JF, UNTERER S, HEILMANN RM, DOWD SE, KACHROO P, IVANOV I, MINAMOTO Y, DILLMAN EM, STEINER JM, COOK AK, TORESSON L (2012). The Fecal Microbiome in Dogs with Acute Diarrhea and Idiopathic Inflammatory Bowel Disease. *PLoS One*. **7**(12): e51907.
- SUCHODOLSKI JS, DOWD SE, WILKE V, STEINER JM, JERGENS AE (2012). 16S rRNA gene pyrosequencing reveals bacterial dysbiosis in the duodenum of dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS One*, **7**: e39333.

- SUDO N, CHIDA Y, AIBA Y, SONODA J, OYAMA N, YU XN, KUBO C, KOGA Y (2004). Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol.*, **558**(1): 263-75.
- SUN T, HEVNER RF (2014). Growth and folding of the mammalian cerebral cortex: from molecules to malformations. *Nat. Rev. Neurosci.*, **15**: 217-232.
- SWANSON KS, DOWD SE, SUCHODOLSKI JS, MIDDELBOSS I, VESTER BM, BARRY KA, NELSON KE, TORRALBA M, HENRISSAT B, COUTINHO PM, CANN IK, WHITE BA, FAHEY JR GC (2011). Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *ISME J.*, **5**: 639-649.
- SWANSON KS, DOWD SE, SUCHODOLSKI JS, MIDDELBOSS IS, VESTER BM, BARRY KA, NELSON KE, TORRALBA M, HENRISSAT B, COUTINHO PM, CANN IK, WHITE BA, FAHEY GC JR (2011). Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *ISME J.*, **5**(4): 639-49.
- SWIDSINSKI A, DÖRFFEL Y, LOENING-BAUCKE V, THEISSIG F, RÜCKERT JC, ISMAIL M, RAU WA, GASCHLER D, WEIZENEGGER M, KÜHN S, SCHILLING J, DÖRFFEL WV (2011). Acute appendicitis is characterised by local invasion with *Fusobacterium nucleatum/necrophorum*. *Gut*, **60**(1): 34-40.
- TAL S, TIKHONOV E, AROCH I, HEFETZ L, TURJEMAN S, KOREN O, KUZU S (2021). Developmental intestinal microbiome alterations in canine fading puppy syndrome: a prospective observational study. *Npj Biofilms Microbiomes.*, **7**: 1-10.
- TAPP PD, SIWAK CT, ESTRADA J, HEAD E, MUGGENBURG BA, COTMAN CW, MILGRAM NW (2003). Size and reversal learning in the beagle dog as a measure of executive function and inhibitory control in aging. *Learning Memory.* **10**(1): 64-73.
- TENG F, DARVEEKARAN NAIR SS, ZHU P, LI S, HUANG S, LI X, XU J, YANG F (2018). Impact of DNA extraction method and targeted 16S-rRNA hypervariable region on oral microbiota profiling. *Sci Rep.*, **8**(1): 16321.
- THE WHOQOL GROUP (1995). The World Health Organization quality of life assessment (WHOQOL): Position paper from the World Health Organization. *Soc. Sci. Med.*, **41**: 1403-1409.
- TIAN P, CHEN Y, ZHU H, WANG L, QIAN X, ZOU R, ZHAO J, ZHANG H, QIAN L, WANG Q, WANG G, CHEN W (2022). *Bifidobacterium breve* CCFM1025 attenuates major depression disorder via regulating gut microbiome and tryptophan metabolism: A randomized clinical trial. *Brain Behav Immun.*, **100**: 233-241.
- TIZARD IR (2004). *Veterinary Immunology: An Introduction*.
- TIZARD IR (2018). *Veterinary Immunology*.
- TIZARD IR (2019). *Vaccines for Veterinarians*. (1st ed.), Elsevier.
- TIZARD IR, JONES SW (2018). The microbiota regulates immunity and immunologic diseases in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, **48**: 307-22.
- TOMLJENOVIC L (2011). Aluminum and Alzheimer's disease: after a century of controversy, is there a plausible link? *J Alzheimers Dis.*, **23**(4): 567-98.
- TOMLJENOVIC L, BLAYLOCK RL, SHAW CA (2014). *Autism Spectrum Disorders and Aluminum Vaccine Adjuvants. Comprehensive Guide to Autism*. Springer, New York, NY.
- TOMLJENOVIC L, SHAW CA (2011a). Aluminum vaccine adjuvants: are they safe? *Curr Med Chem.*, **18**(17): 2630-7.

- TOMLJENOVIC L, SHAW CA (2011b). Do aluminum vaccine adjuvants contribute to the rising prevalence of autism? *J Inorg Biochem.*, **105**(11): 1489–99.
- TOPÁL J, MIKLÓSI Á, GÁCSI M, DÓKA A, PONGRÁCZ P, KUBINYI E, VIRÁNYI Z, CSÁNYI V (2009). Chapter 3: The dog as a model for understanding human social behavior. *Adv. Study Behav.*, **39**: 71–116.
- TSIGOS C, CHROUSOS GP (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psychosom. Res.*, **53**: 865–871.
- TUN HM, BRAR MS, KHIN N, JUN L, HUI RK, DOWD SE, LEUNG FC (2012). Gene-centric metagenomics analysis of feline intestinal microbiome using 454 junior pyrosequencing. *J Microbiol Methods.*, **88**(3): 369–76.
- ULRICH-LAI YM, HERMAN JP (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci.*, **10**: 397–409.
- UNNIKRISHNAN M, RAPPUOLI R, SERRUTO D (2012). Recombinant bacterial vaccines. *Current Opinion in Immunology.* **24**(3): 337–342.
- VADALÀ M, PODDÍGHE D, LAURINO C, PALMIERI B (2017). Vaccination and autoimmune diseases: is prevention of adverse health effects on the horizon? *EPMA J.*, **8**: 295–311.
- VAN DEN ELSEN LW, POYNTZ HC, WEYRICH LS, YOUNG W, FORBES-BLOM EE (2017). Embracing the gut microbiota: the new frontier for inflammatory and infectious diseases. *Clin Transl Immunol.*, **6**(1): e125.
- VAN GELDER P, MAKOSCHEY B (2012). Production of viral vaccines for veterinary use. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.*, **125** (3–4): 103–109.
- VAYSSE A, RATNAKUMAR A, DERRIEN T, AXELSSON E, ROSENGREN PIELBERG G, SIGURDSSON S, FALL T, SEPPALA EH, HANSEN MST, LAWLEY CT, KARLSSON EK, BANNASCH D, VILA C, LOHI H, GALIBERT F, FREDHOLM M, HAGGSTROM J, HEDHAMMAR A, ANDRE C, LINDBLAD-TOH K, HITTE C, WEBSTER MT (2011). Identification of genomic regions associated with phenotypic variation between dog breeds using selection mapping. *PLoS Genet.*, **7**: e1002316.
- VAZQUEZ-BAEZA Y, HYDE ER, SUCHODOLSKI JS, KNIGHT R (2016). Dog and human inflammatory bowel disease rely on overlapping yet distinct dysbiosis networks. *Nature Microbiol.*, **1**: 16177.
- VÁZQUEZ-BAEZA Y, HYDE ER, SUCHODOLSKI JS, KNIGHT R (2016). Dog and human inflammatory bowel disease rely on overlapping yet distinct dysbiosis networks. *Nat. Microbiol.*, **1**: 16177.
- VAZQUEZ-BAEZA Y, HYDE ER, SUCHODOLSKI JS, KNIGHT R (2016). Dog and human inflammatory bowel disease rely on overlapping yet distinct dysbiosis networks. *Nat Microbiol.*, **1**: 16177.
- VICH VILA A, IMHANN F, COLLIJ V, JANKIPERSADSING SA, GURRY T, MUJAGIC Z, KURILSHIKOV A, BONDER MJ, JIANG X, TIGCHELAAR EF, DEKENS J, PETERS V, VOSKUIL MD, VISSCHEDIJK M C, DULLEMEN H M, KESZTHELYI D, SWERTZ M A, FRANKE L, ALBERTS R, FESTEN E A M, DIJKSTA G, MASCLÉE A A M, HOFKER M H, XAVIER R, ALMEJ, FY J, JONKERS DMA, ZHERNAKOVA A, WEERSMA RK (2018). Gut Microbiota Composition and Functional Changes in Inflammatory Bowel Disease and Irritable Bowel Syndrome. *Sci. Transl. Med.*, **10**: eaap8914.
- VILSON A, RAMADAN Z, LI Q, HEDHAMMAR A, REYNOLDS A, SPEARS J, LABUDA J, PELKER R, BJÖRKSTEN B, DICKSVED J, HANSSON-HAMLIN H (2018). Disentangling factors that shape the gut microbiota in German Shepherd dogs. *PLoS ONE.* **13**: e0193507.

- VITAL M, GAO J, RIZZO M, HARRISON T, TIEDJE JM (2015). Diet is a major factor governing the fecal butyrate-producing community structure across Mammalia, Aves and Reptilia. *ISME J.*, **9**: 832–43.
- WANG S, MARTINS R, SULLIVAN MC, FRIEDMAN ES, MISIC AM, EL-FAHMAWI A, DE MARTINIS ECP, O'BRIEN K, CHEN Y, BRADLEY C, ZHANG G, BERRY ASF, HUNTER CA, BALDASSANO RN, RONDEAU MP, BEITING DP (2019). Diet-induced remission in chronic enteropathy is associated with altered microbial community structure and synthesis of secondary bile acids. *Microbiome*, **7**(1): 126.
- WEHRWEIN EA, ORER HS, BARMAN SM (2016). Overview of the Anatomy, Physiology, and Pharmacology of the Autonomic Nervous System. *Compr Physiol.*, **6**: 1239–1278.
- WERNER M, SUCHODOLSKI JS, LIDBURY JA, STEINER JM, HARTMANN K, UNTERER S (2020). Diagnostic value of fecal cultures in dogs with chronic diarrhea. *J Vet Intern Med.*, **35**(1): 199–208.
- WHITFIELD-CARGILE CM, COHEN ND, CHAPKIN RS, WEEKS BR, DAVIDSON LA, GOLDSBY JS, HUNT CL, STEINMEYER SH, MENON R, SUCHODOLSKI JS, JAYARAMAN A, ALANIZ RC (2016). The microbiota-derived metabolite indole decreases mucosal inflammation and injury in a murine model of NSAID enteropathy. *Gut Microbes.* **7**: 246–261.
- WITHERS SS, MOORE PF, CHANG H, CHOI JW, MCSORLEY SJ, KENT MS, MONJAZEB AM, CANTER RJ, MURPHY WJ, SPARGER EE, REBHUN RB (2018). Multi-color flow cytometry for evaluating age-related changes in memory lymphocyte subsets in dogs. *Dev Comp Immunol.*, **87**: 64–74.
- WOJCIECHOWSKA JI, HEWSON CJ, STRYHN H, GUY NC, PATRONEK GJ, TIMMONS V (2005). Development of a discriminative questionnaire to assess nonphysical aspects of quality of life of dogs. *Am. J. Vet. Res.*, **66**: 1453–1460.
- WOOD DE, LU J, LANGMEAD B (2019). “Improved Metagenomic Analysis with Kraken 2.” *Genome Biol.*, **20** (1): 257.
- XU C, ZHU H, QIU P (2019). Aging progression of human gut microbiota. *BMC Microbiol.*, **19**: 236–10.
- YANO JM, YU K, DONALDSON GP, SHASTRI GG, ANN P, MA L, NAGLER CR, ISMAGILOV RF, MAZMANIAN SK, HSIAO EY (2015). Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell*, **161**(2): 264–76.
- YANO JM, YU K, DONALDSON GP, SHASTRI GG, ANN P, MA L, NAGLER CR, ISMAGILOV RF, MAZMANIAN SK, HSIAO EY (2015). Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell*. **161**: 264–276.
- YATSUNENKO T, REY FE, MANARY MJ, TREHAN I, DOMINGUEZ-BELLO MG, CONTRERAS M, MAGRIS M, HIDALGO G, BALDASSANO RN, ANOKHIN AP, HEATH AC, WARNER B, REEDER J, KUCZYNSKI J, CAPORASO JG, LOZUPONE CA, LAUBER C, CLEMENTE JC, KNIGHTS D, KNIGHT R, GORDON JI (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, **486**: 222–7.
- YOU I, KIM MJ (2021). Comparison of gut microbiota of 96 healthy dogs by individual traits: breed, age, and body condition score. *Animals*. **11**: 2432.
- YOUNG W, MOON CD, THOMAS DG, CAVE NJ, BERMINGHAM EN (2016). Pre- and post-weaning diet alters the faecal metagenome in the cat with differences in vitamin and carbohydrate metabolism gene abundances. *Sci Rep.*, **6**: 34668.
- YUAN N, CHEN Y, XIA Y, DAI J, LIU C (2019). Inflammation-related biomarkers in major psychiatric disorders: a cross-disorder assessment of reproducibility and specificity in 43 meta-analyses. *Transl. Psychiatry.*, **9**: 233.

- ZAKOŠEK PIPAN M, KAJDIČ L, KALIN A, PLAVEC T, ZDOVC I (2020). Do newborn puppies have their own microbiota at birth? Influence of type of birth on newborn puppy microbiota. *Theriogenology*. **152**: 18–28.
- ZHENG G, WU SP, HU Y, SMITH DE, WILEY JW, HONG S (2013). Corticosterone mediates stress-related increased intestinal permeability in a region-specific manner. *Neurogastroenterol. Motil.*, **25**: 127–139.
- ZHUANG ZQ, SHEN LL, LI WW, FU X, ZENG F, GUI L, LÜ Y, CAI M, ZHU C, TAN YL, ZHENG P, LI HY, ZHU J, ZHOU HD, BU XL, WANG YJ (2018). Gut Microbiota is Altered in Patients with Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.*, **63**(4):1337-1346.
- ZIESE AL, SUCHODOLSKI JS (2021). Impact of changes in gastrointestinal microbiota in canine and feline digestive diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, **51**(1): 155- 169.
- ZORAN DL (2010). Obesity in dogs and cats: a metabolic and endocrine disorder. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, **40**: 221–239.



EKLER

Ek-1 Etik Kurul Kararı

ANKARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR ÖRNEĞİ

TOPLANTI TARİHİ : 04/03/2020
TOPLANTI NO : 2020-5
DOSYA NO : 2020-29
KARAR NO : 2020-5-38

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Yasemin SALGIRLI DEMİRBAŞ'ın yaptığı; araştırmacı olarak Prof. Dr. Aykut ÖZKUL, Prof. Dr. Hakan ÖZTÜRK, Vet. Hek. Begüm SARAL ve Vet. Hek. Deniz ADIAY'ın katıldığı "Yıllık Aşılamanın Senyör Köpeklerde Kaygı ve Bilişsel Fonksiyon Bozukluğu ile Fekal Mikrobiyota Üzerine Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı çalışma Kurulumuzca değerlendirilmiş ve söz konusu çalışmanın Üniversite senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi"ne göre değerlendirilerek etik kurul iznine tabi olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

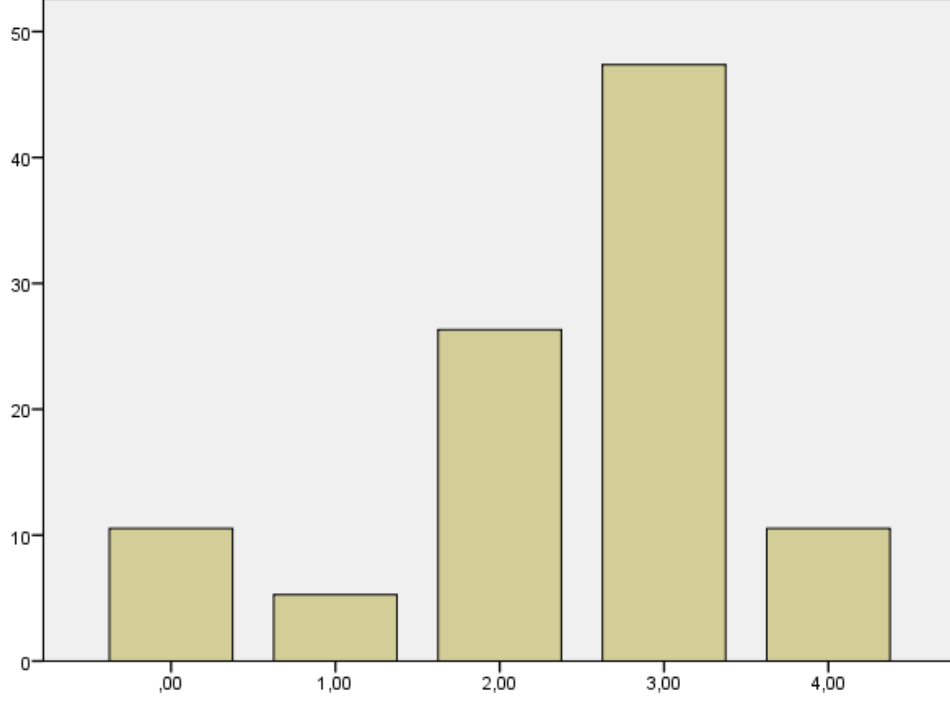
Geçerlilik Süresi : 01/09/2020-01/09/2021

ASLININ AYNIDIR
04/03/2020

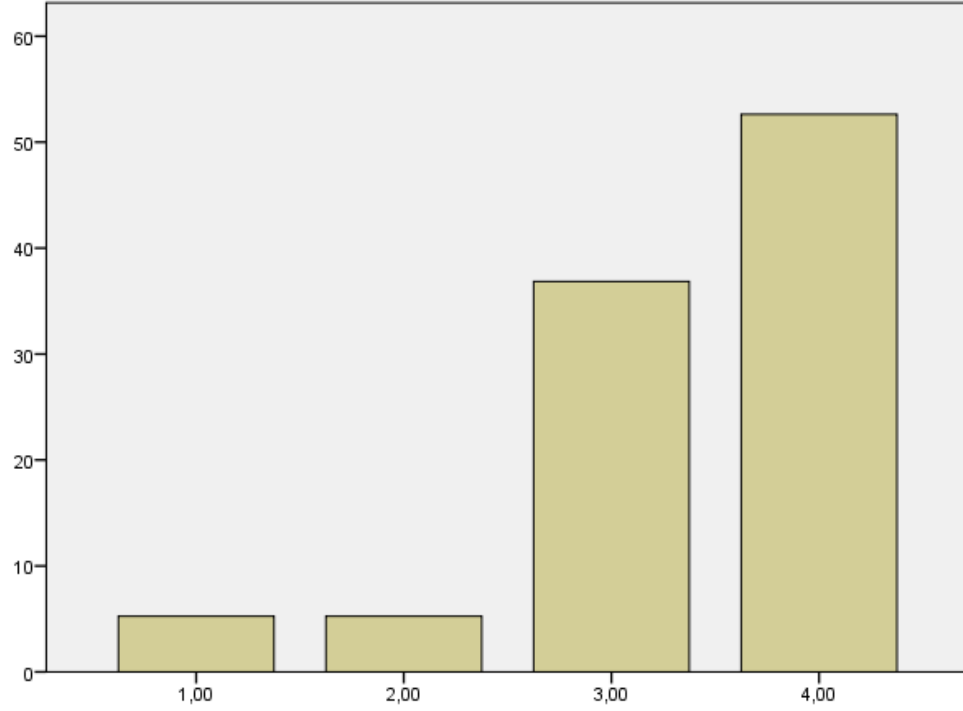
Prof.Dr.M.Taner KARAOĞLU
A.Ü. HADYЕК Başkanı

Ek-2 Hasta Sahipleri Tarafından Doldurulan Yaşam Kalitesi Ölçeği Skorlarının Grafikleri:

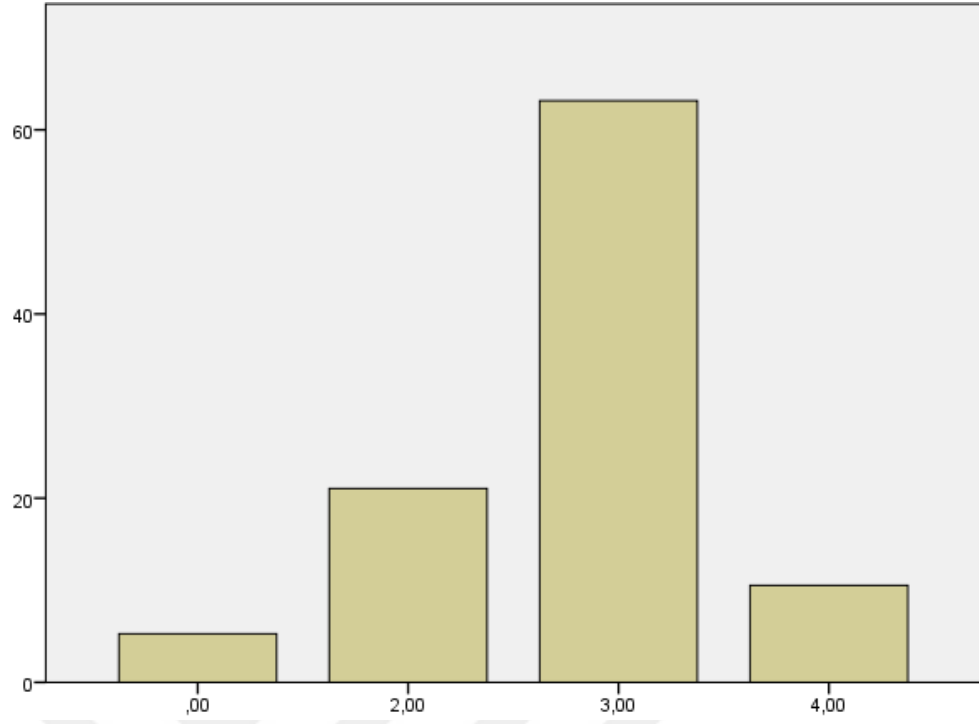
1. Mutlukla ilişkili skorlar:



Köpeğim oyun oynamak istiyor.

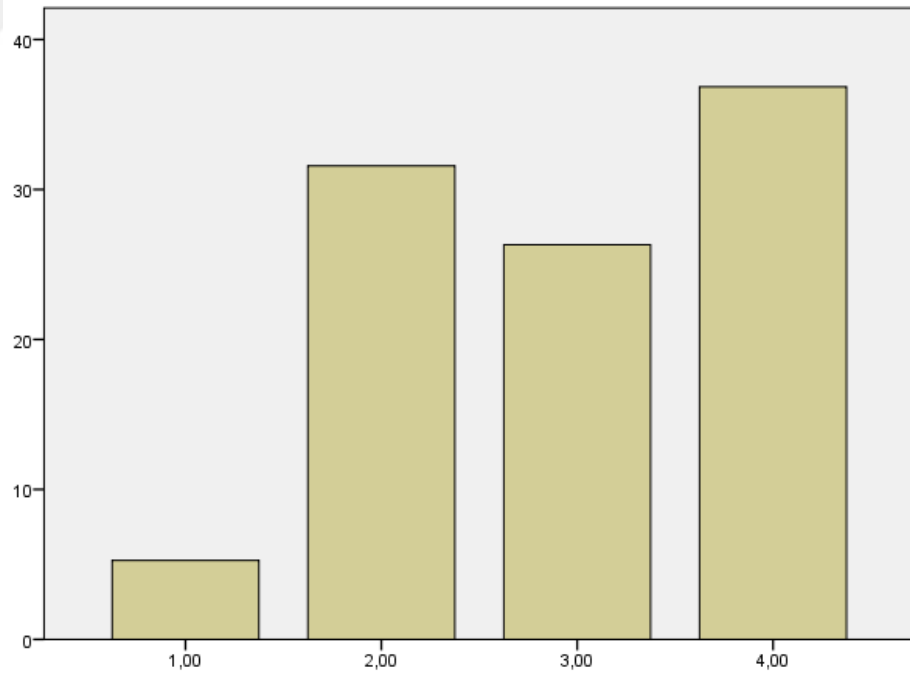


Köpeğim benim varlığıma tepki veriyor.

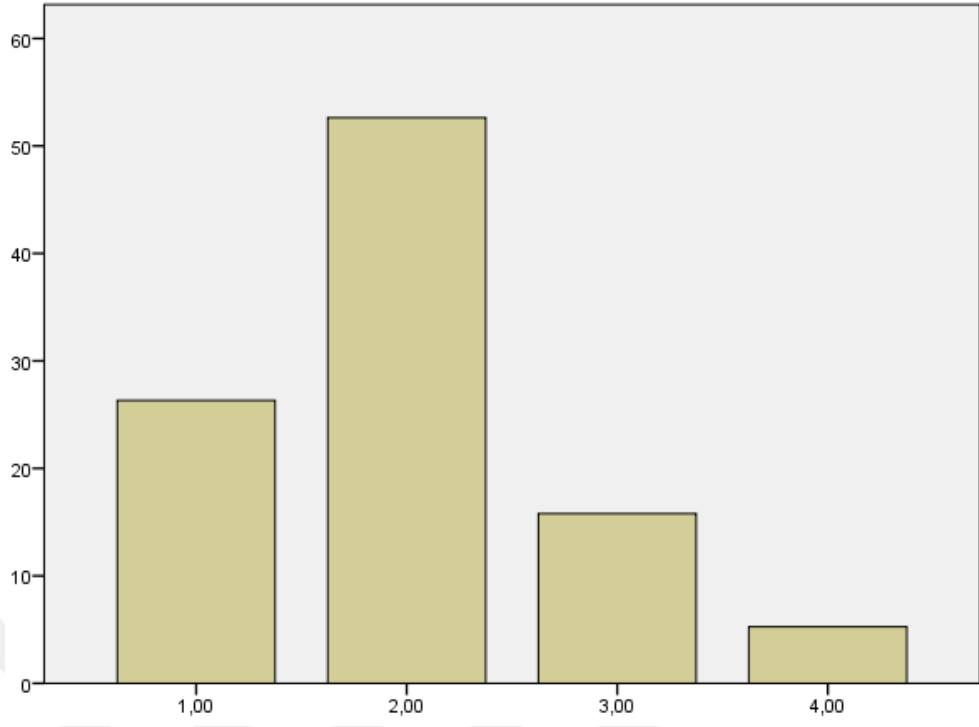


Köpeğim hayattan keyif alıyor.

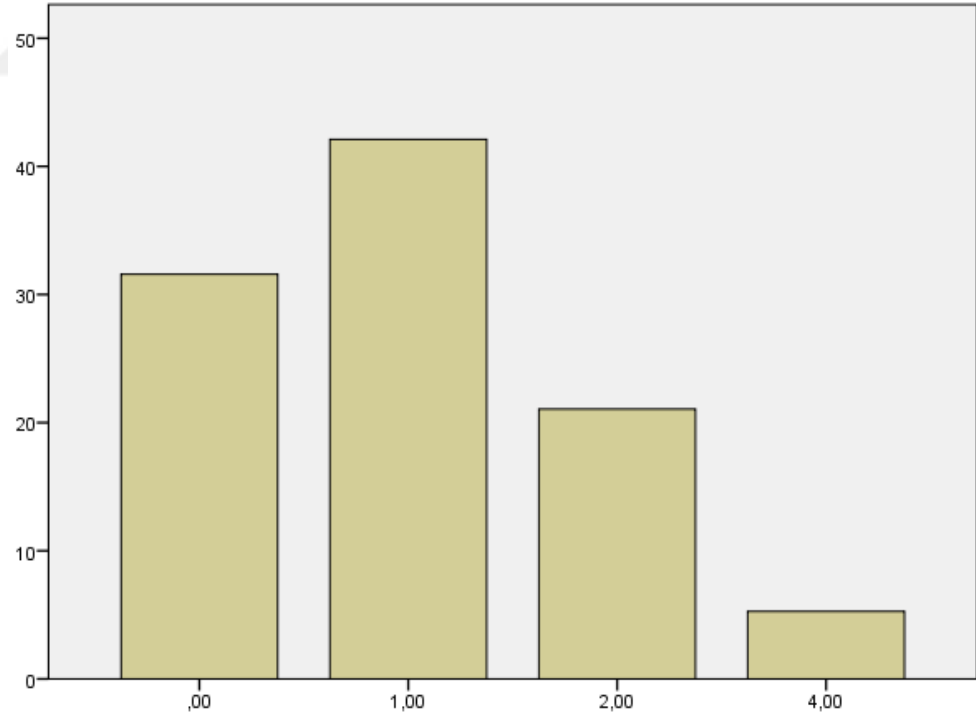
2. Mental Durum:



Köpeğimin kötü geçen günlerinden daha çok iyi geçen günleri var.

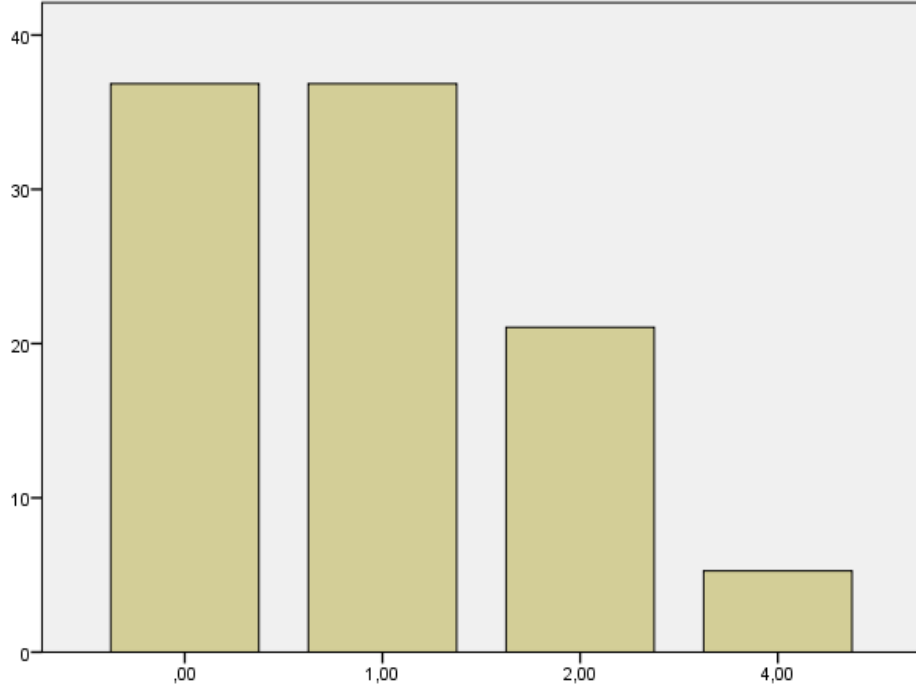


Köpeğim genellikle uyur, gün içerisinde uyanık olduğu zaman daha azdır.

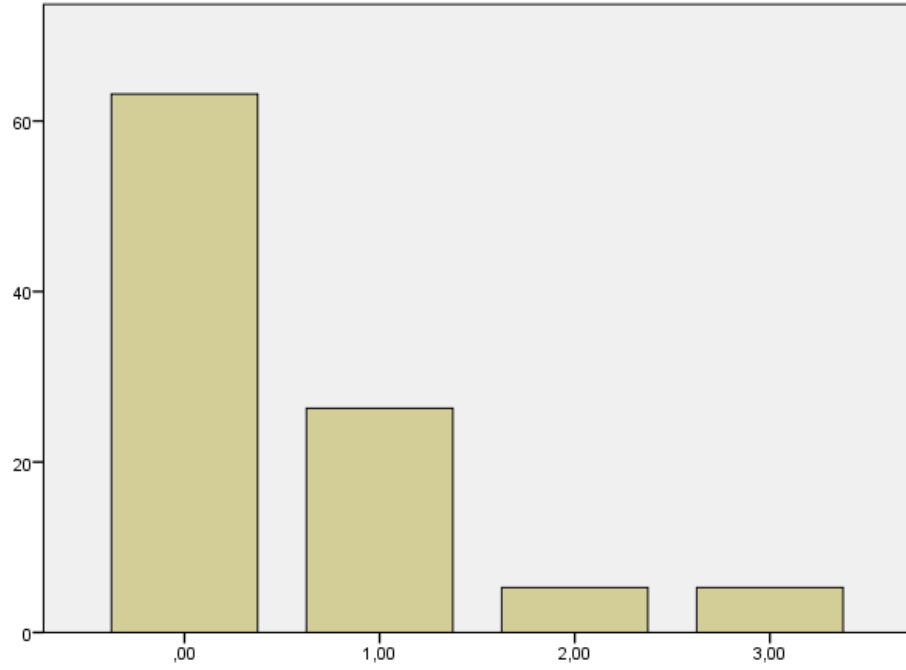


Köpeğim durgun ve/veya depresif görünüyor, tetikte değil.

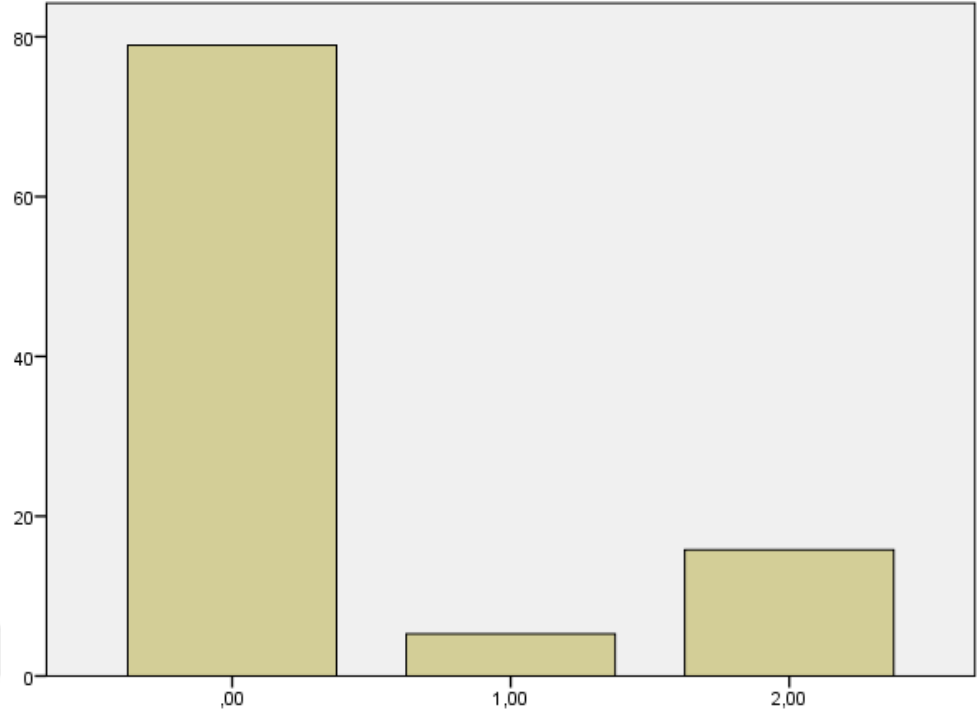
3. Ağrı:



Köpeğim acı çekiyor.

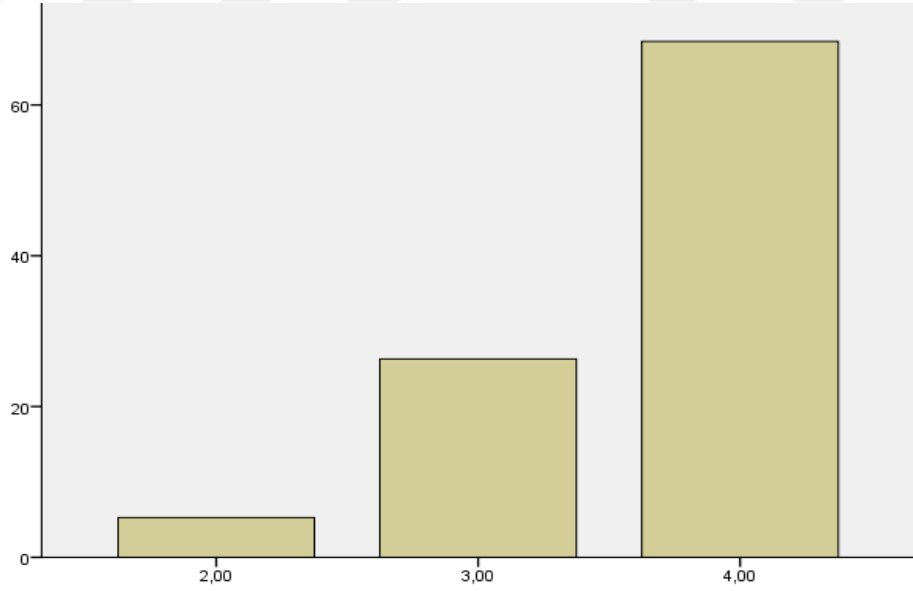


Köpeğim dinlenirken bile hızlı ve sık nefes alıp veriyor.

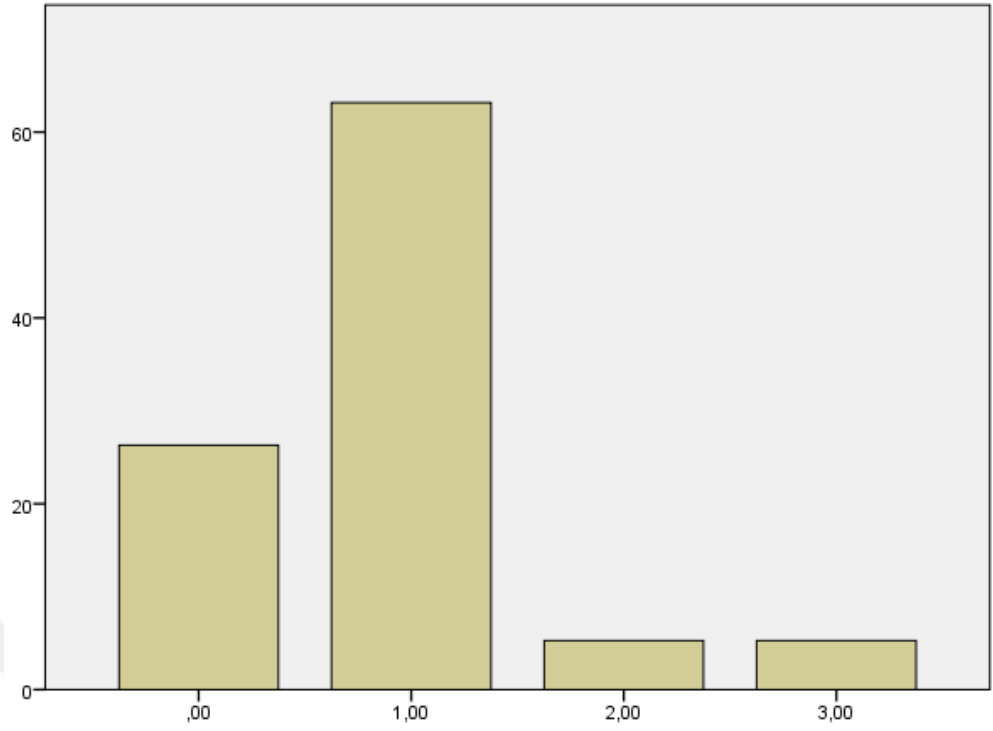


Köpeğim ara sıra sallanıyor ve/veya titriyor.

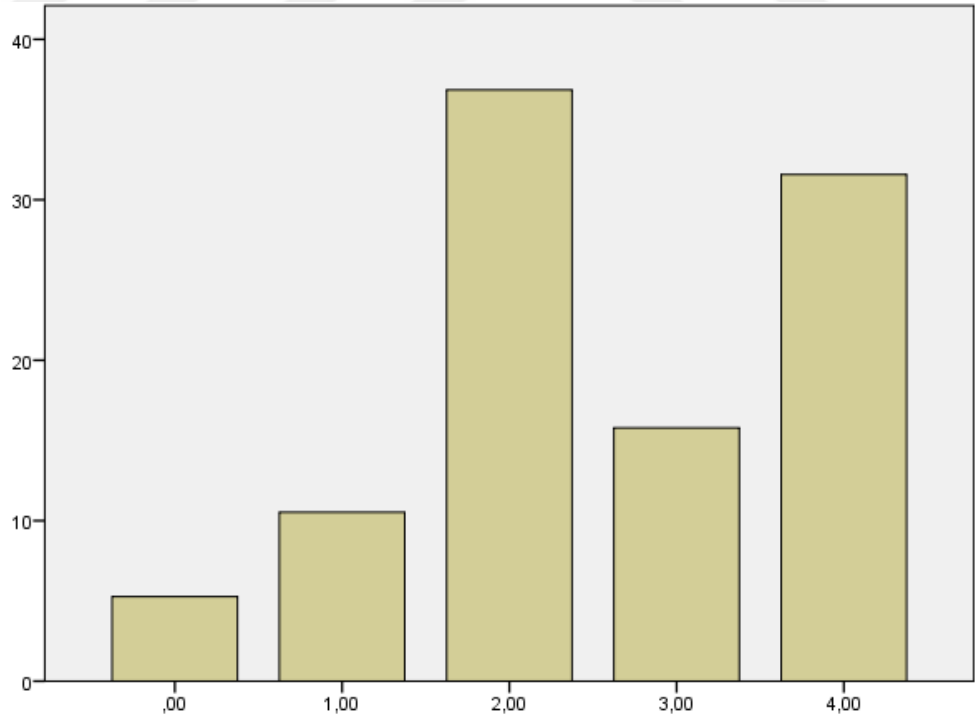
4. İştah:



Köpeğim normal-her zamanki kadar miktarda mama yiyor.

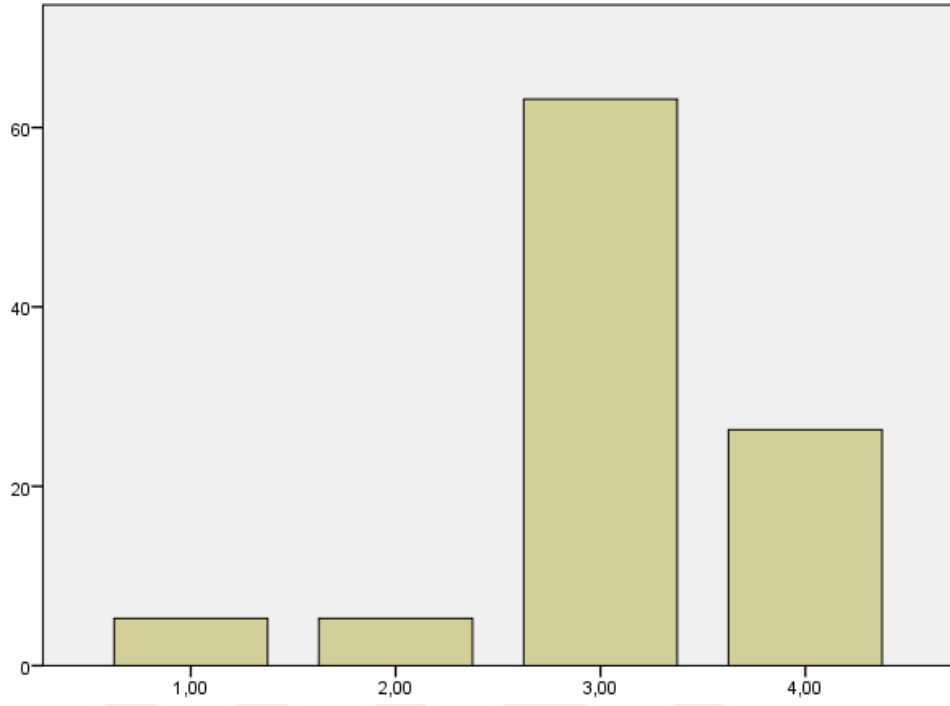


Köpeğimin midesi bulanıyor ve/veya kusuyor.

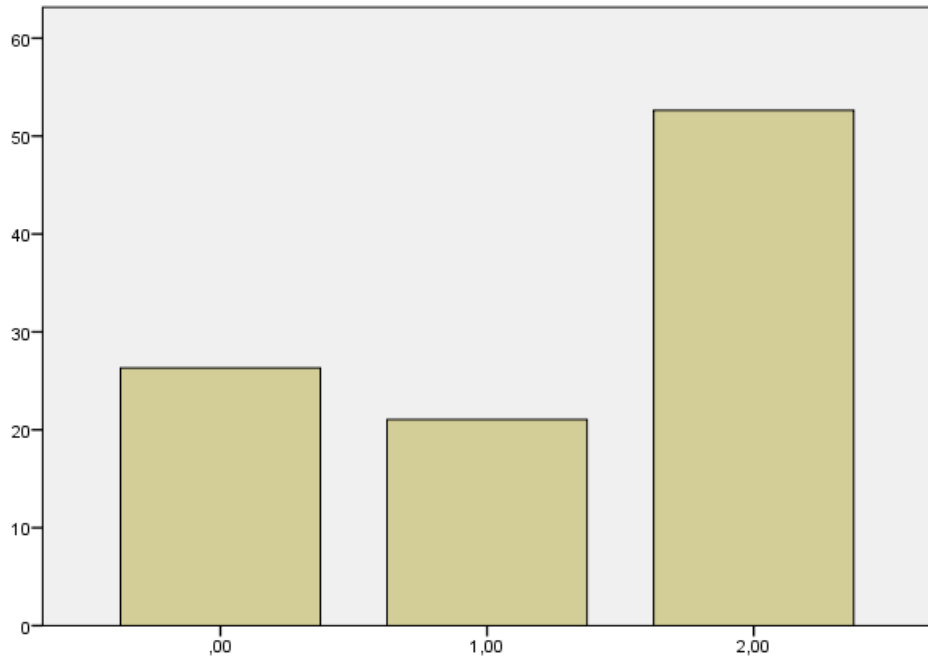


Köpeğim ödül maması/atıştırma bir şeyler yer.

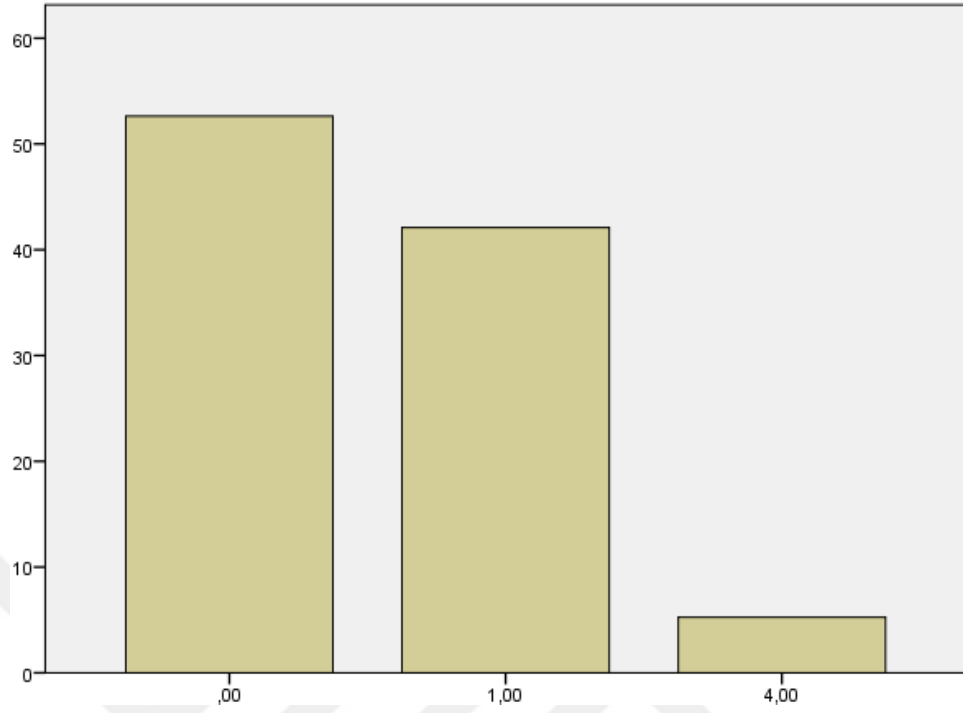
5. Hijyen:



Köpeğim kendisini temiz tutar.

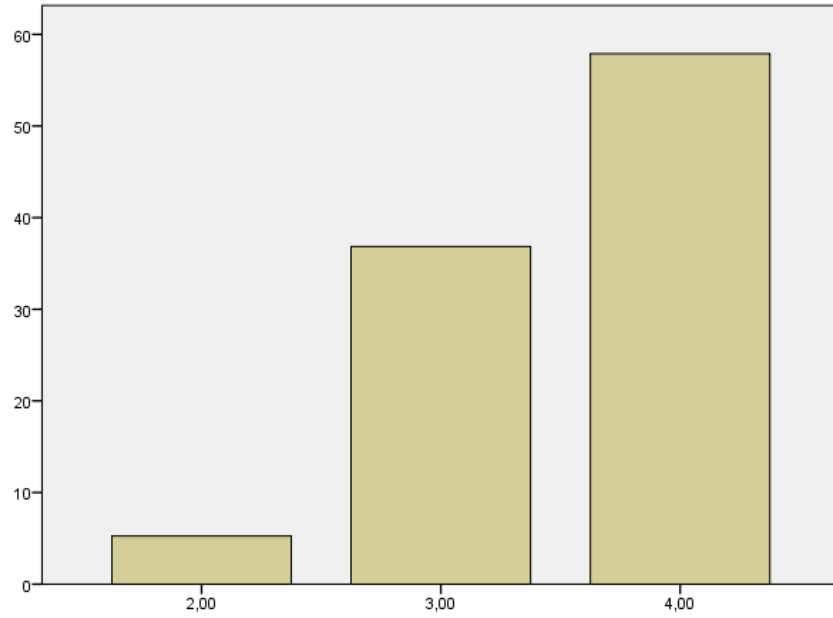


Köpeğimde kötü bir koku var ve/veya deri kaşıntısı-hassasiyeti var.

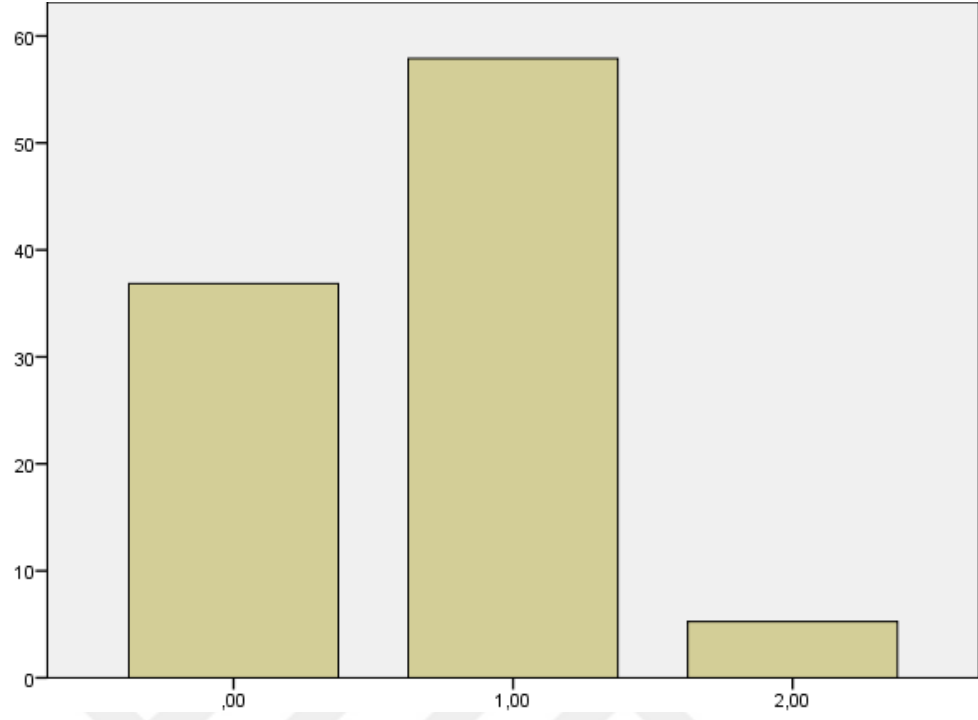


Köpeğimin tüyleri yağlı, keçeleşmiş, pürüzlü görünüyor.

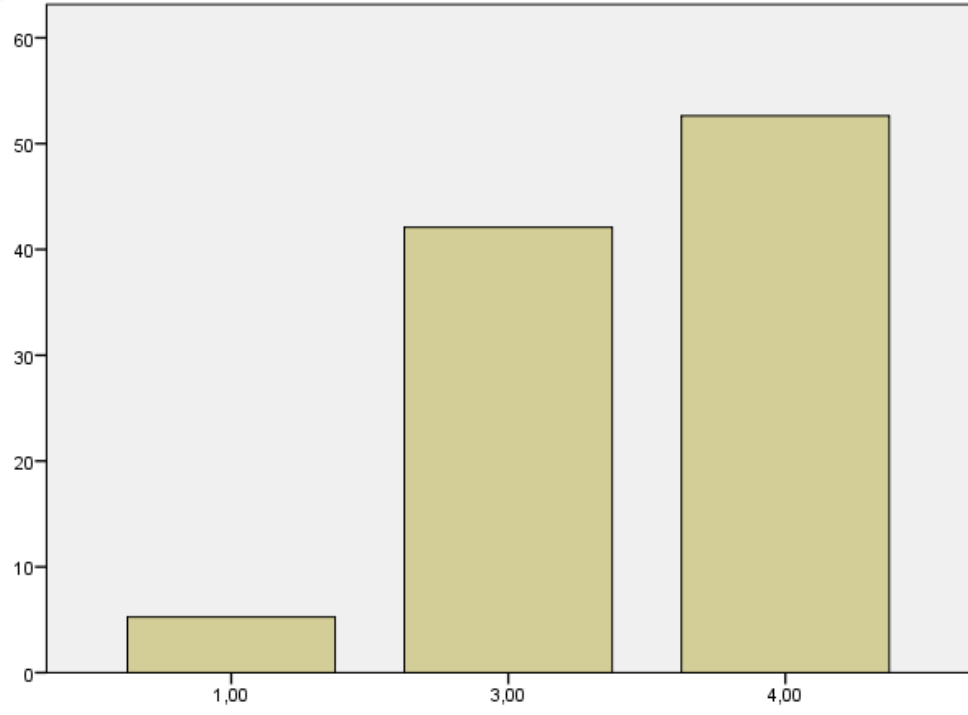
6. Sıvı Dengesi:



Köpeğim yeterli miktarda su içiyor.

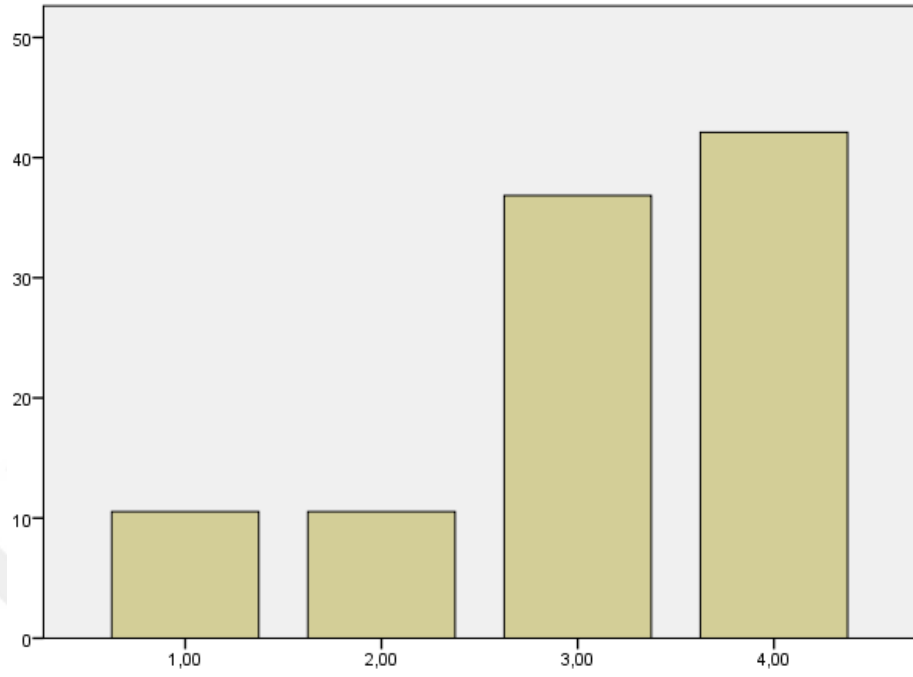


Köpeğimin ishali var.

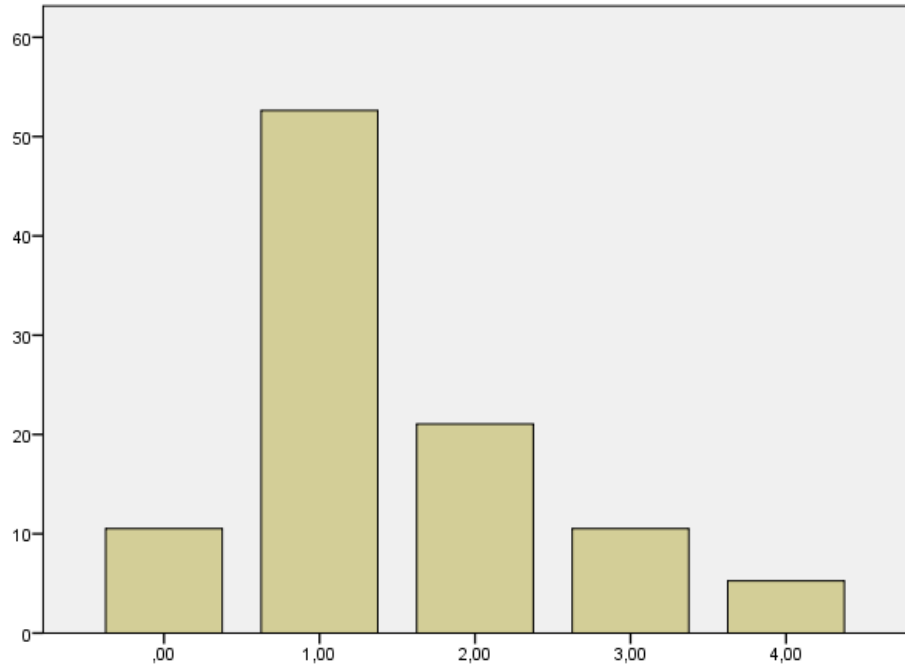


Köpeğim normal miktarda idrar yapıyor.

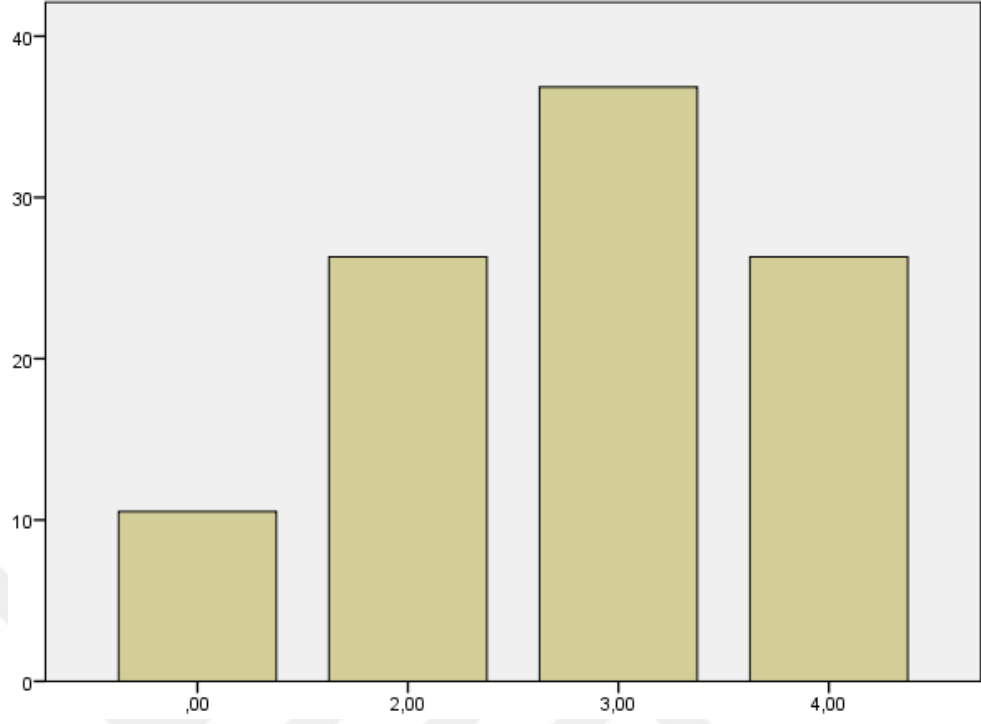
7. Hareketlilik:



Köpeğim normal bir şekilde hareket ediyor/yürüyor.



Köpeğim bütün gün tek bir yerde yatıyor.



Köpeğim geçmişte olduğu kadar aktif.

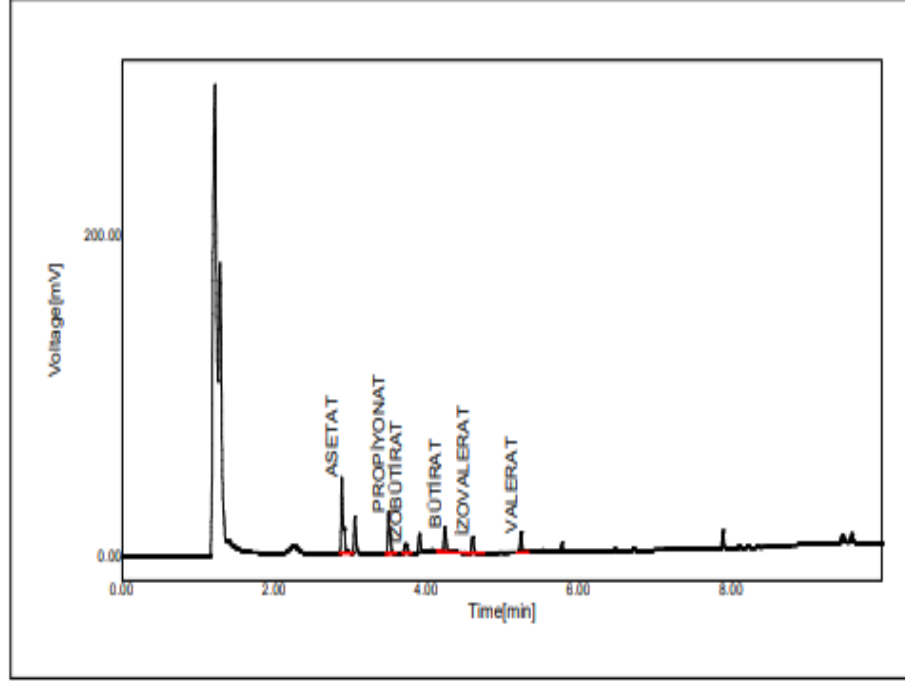
Ek-3 Kısa Zincirli Yağ Asidi Bileşimini Gösteren Örnek Sonuçlar

Analysis

Sample Name: Bozo
Sample ID:
File: 0010.RAW

Date: 2023-04-03 PM 12:45:35
Channel: 1. GC A

Chromatogram



Result

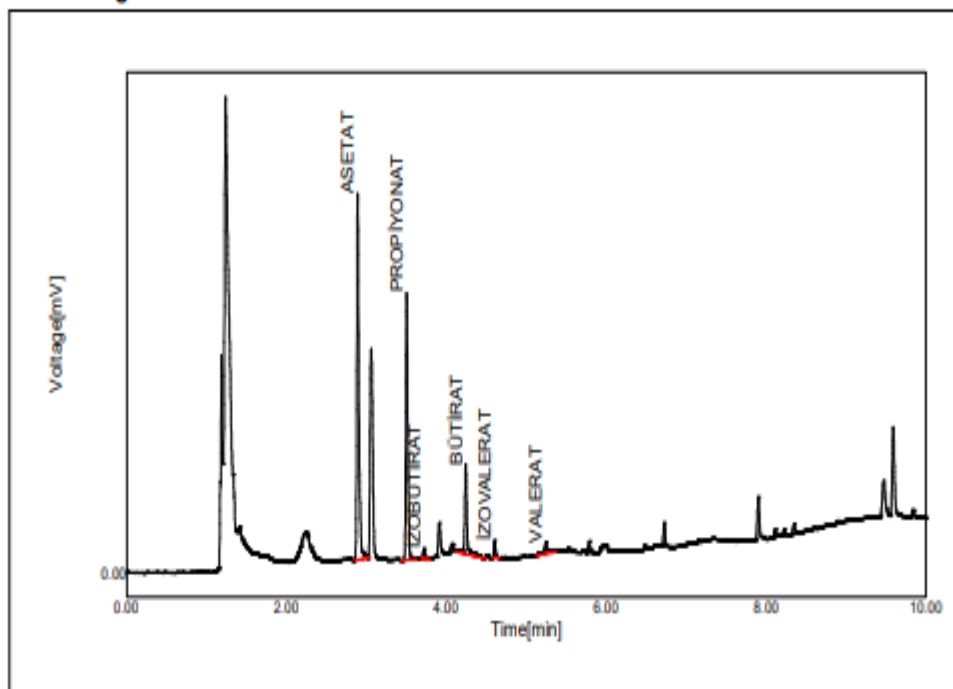
No.	Name	RT[min]	Area[mV*s]	Height[mV]	Amount[g]
1	ASETAT	2.8900	94.5041	47.4847	2.0717
2	PROPİYONAT	3.5017	51.5684	26.0387	0.6332
3	İZOBÜTİRAT	3.7200	14.5527	5.7585	0.1282
4	BÜTİRAT	4.2400	37.4935	15.1276	0.3063
5	İZOVALERAT	4.6050	20.7512	10.1289	0.1389
6	VALERAT	5.2417	22.1488	12.3167	0.1483
Sum			241.0187	116.8551	3.4265

Analysis

Sample Name: **Neri**
Sample ID:
File: **0011.RAW**

Date: 2023-04-03 PM 01:01:04
Channel: 1. GC A

Chromatogram



Result

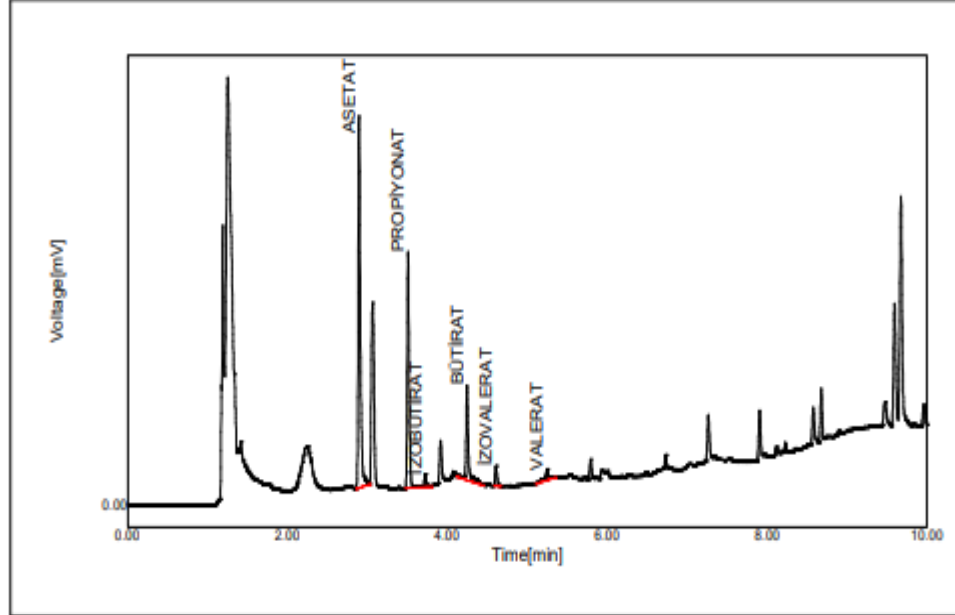
No.	Name	RT[min]	Area[mV*s]	Height[mV]	Amount[g]
1	ASETAT	2.8917	99.6068	56.0557	2.1835
2	PROPIONAT	3.5050	69.1276	40.8739	0.8488
3	IZOBUTIRAT	3.7200	2.6975	1.5204	0.0238
4	BUTIRAT	4.2433	26.6100	13.6964	0.2174
5	IZOVALERAT	4.6050	4.0364	2.6139	0.0270
6	VALERAT	5.2433	5.2667	1.7882	0.0353
Sum			207.3451	116.5484	3.3357

Analysis

Sample Name: **Smley**
Sample ID:
File: **0012.RAW**

Date: **2023-04-03 PM 01:16:34**
Channel: **1. GC A**

Chromatogram



Result

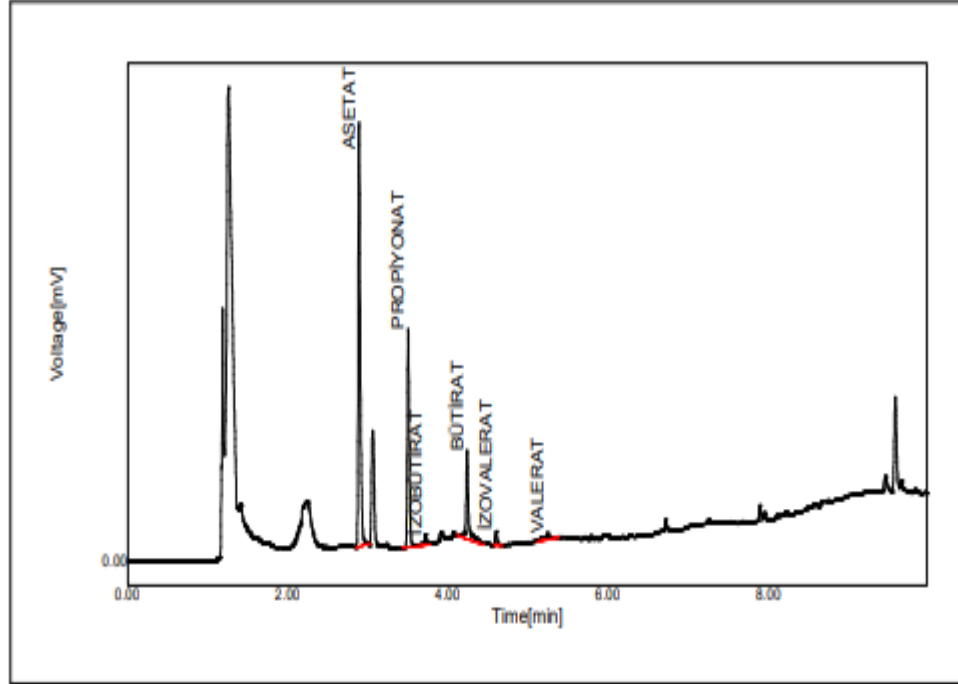
No.	Name	RT[min]	Area[mV*s]	Height[mV]	Amount[g]
1	ASETAT	2.8967	73.7787	40.0191	1.6173
2	PROPIYONAT	3.5100	42.9850	25.4022	0.5278
3	İZOBÜTİRAT	3.7250	3.0136	1.4346	0.0265
4	BÜTİRAT	4.2467	21.3926	10.1479	0.1748
5	İZOVALERAT	4.6083	3.6862	2.1579	0.0247
6	VALERAT	5.2483	4.0097	1.2179	0.0268
Sum			148.8659	80.3797	2.3979

Analysis

Sample Name: Barut
Sample ID:
File: 0013.RAW

Date: 2023-04-03 PM 01:32:06
Channel: 1. GC A

Chromatogram



Result

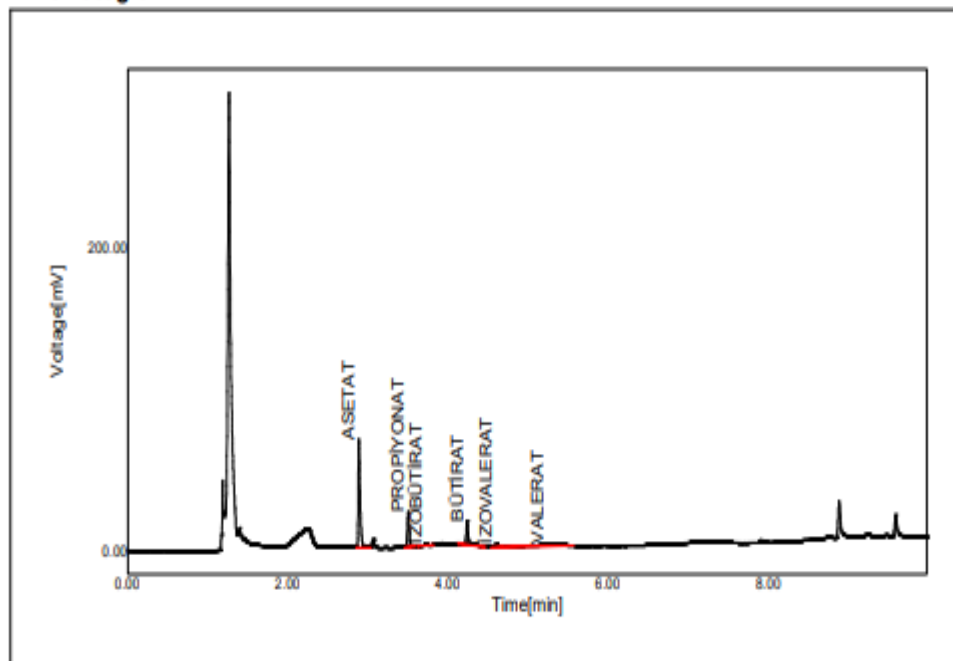
No.	Name	RT[min]	Area[mV*s]	Height[mV]	Amount[μ g]
1	ASETAT	2.8917	96.4444	53.7256	2.1142
2	PROPİYONAT	3.5050	48.2672	27.6629	0.5926
3	İZOBÜTİRAT	3.7183	2.8095	1.2983	0.0247
4	BÜTİRAT	4.2417	25.0628	11.2522	0.2047
5	İZOVALERAT	4.6033	3.1686	1.7655	0.0212
6	VALERAT	5.2417	4.2596	0.8196	0.0285
Sum			180.0122	96.5242	2.9860

Analysis

Sample Name: **Alex**
Sample ID:
File: **0014.RAW**

Date: **2023-04-03 PM 01:47:22**
Channel: **1. GC A**

Chromatogram



Result

No.	Name	RT[min]	Area[mV*s]	Height[mV]	Amount[g]
1	ASETAT	2.8900	121.0313	71.2875	2.6532
2	PROPIONAT	3.5050	37.1211	22.9920	0.4558
3	İZOBÜTİRAT	3.7183	3.3648	1.4805	0.0296
4	BÜTİRAT	4.2417	32.5354	15.5369	0.2658
5	İZOVALERAT	4.6033	4.1609	2.3359	0.0278
6	VALERAT	5.2400	27.7847	1.2411	0.1860
Sum			225.9981	114.8739	3.6183

Ek-4 Hemogram ve FT4 Sonuçları

Grup	İsim	WBC	LYM#	MID#	GRA#	LYM%	MID%	GRA%	RBC	HGB	MCHC	MCH	MCV	RDWCV	RDWSD	HCT	PLT	MPV	PDW	PCT	P-LCR
1	Bel.	5,17	3,63	0,46	1,08	70,3	8,9	20,8	7,29	15,7	32,1	21,5	67	12,6	40,3	48,8	196	8	16,3	0,158	20,9
1	Smi.	5,15	1,58	0,61	2,96	30,7	11,8	57,5	7,14	15,5	32,8	21,7	66,2	13,5	41,7	47,2	232	8,2	15,1	0,19	20,9
1	Ali.	15,05	2,81	0,6	11,64	18,7	4	77,3	4,61	13,6	43,9	29,4	67	12,2	36,4	30,9	399	6,9	12,6	0,277	10,1
1	Mi.	8,21	1,74	0,45	6,02	21,2	5,5	73,3	8,53	20,3	35,7	23,8	66,7	13,4	42,5	56,9	345	7,6	16,1	0,262	14,5
1	Ale.	6,59	1,6	0,44	4,55	24,3	6,7	69	8,33	19,8	36,4	23,8	65,3	12,1	38,2	54,4	292	7,7	15,1	0,225	15,3
1	Dor.	6,5	1,2	0,33	4,48	18,7	5,6	68,7	7,76	23,2	36,8	24,7	67	12,6	39,5	55,1	329	7,4	16,7	0,243	12,7
1	Par.	7,84	1,34	0,39	6,11	17,1	5	77,9	9,02	20,6	36	22,8	63,4	13,6	40,7	57,2	389	7,3	12	0,285	14,3
1	Hay.	7,2	1,54	0,44	5,78	19,8	5,6	74,6	7,06	15,2	34,1	21,5	63	12,8	38,4	48,1	415	6,9	11,5	0,288	9,2
2	Fin.	8,37	1,62	0,38	6,37	19,3	4,5	76,2	7,47	17,3	33,2	23,2	69,9	12,4	41,1	52,2	273	7,8	14,7	0,212	17,1
2	Ner.	5,31	4,04	0,37	0,9	76,1	7	16,9	7,63	16,1	32,1	21,2	65,8	13	40,4	50,2	308	7,4	15,2	0,226	12,1
2	Tar.	7,7	3,54	0,9	3,87	46	3,7	50,3	8,58	12	26,1	13,9	53,4	14,2	28,4	45,8	487	7,4	16,4	0,361	13
2	Bar.	3,83	1,07	0,22	2,54	28	5,8	66,2	4,73	11,1	36,3	23,4	64,5	12,3	36,7	30,5	149	7,3	15,2	0,109	12,4
2	Bad.	5,34	1,02	0,22	4,1	19,1	4,2	76,7	6,41	15,9	37,1	24,8	66,8	11,8	37,9	42,8	270	8	14,6	0,215	17,6
2	Bl.	7,45	1,3	0,31	5,84	17,4	4,2	78,4	8,2	19,8	35,8	24,1	67,3	13	41,6	55,1	385	7,7	14,2	0,297	15,1
2	Lat.	5,15	1,31	0,33	3,23	18,7	5,6	75,7	8,32	19,3	34,6	23,2	67,1	12,6	39,5	55,8	275	7,4	14,8	0,24	12,7
2	Boz.	8,23	6	0,48	1,75	72,9	5,8	21,3	7,99	17,6	33,2	22	66,2	20,2	70,6	52,9	214	7,2	18,1	0,153	12,6
2	Opr.	5,77	4,61	0,39	0,77	80	6,8	13,2	6,81	14,9	33,6	21,9	65,4	12,9	39,6	44,5	316	6,8	14,2	0,215	10
2	Sho.	15,81	8,6	0,9	6,31	54,4	5,7	39,9	7,55	17,2	33,4	22,8	68,4	13,5	43,7	51,6	197	8,7	16	0,173	26,2

Grup	İsim	FT4 (pmol/l)
1	Bel.	9,2
1	Sml.	10,4
1	Ali.	11,6
1	Mi.	15,7
1	Ale.	16,2
1	Dor.	9,7
1	Par.	12,5
1	Hay.	19
2	Fin.	19,8
2	Ner.	8,5
2	Tar.	9,3
2	Bar.	17,6
2	Bad.	13,9
2	Bl.	11,2
2	Lat.	8,4
2	Boz.	14,4
2	Opr.	10,2
2	Sho.	13,4
		Referans aralığı: 8,4-38,6 pmol/l

Ek-5 Köpek Sahiplerine Gönderilen Anket Formu

Yıllık Aşılamamanın Senyör Köpeklerde Kaygı, Bilişsel Fonksiyon Bozukluğu ve Fekal Mikrobiyota Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Sayın Katılımcı,

Bu araştırma, senyör köpeklerde bilişsel fonksiyon, yaşam kalitesi, kaygı ve akut-kronik ağrı durumuna bağlı olarak ortaya çıkan davranış değişikliklerini anlamaya yönelik ölçütleri içeren bir anket çalışmasıdır. Bu çalışmaya yalnızca "Yıllık Aşılamamanın Senyör Köpeklerde Kaygı, Bilişsel Fonksiyon Bozukluğu ve Fekal Mikrobiyota Üzerine Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı doktora tez projesine katılım gösteren köpeklerin sahipleri katılım gösterecektir. Cevaplarınız gizli tutulacak ve sadece araştırmacılar tarafından bilimsel amaçlı olarak kullanılacaktır. Araştırma sonuçlarından sağlıklı bilgiler elde edilebilmesi için soruların samimi ve eksiksiz bir şekilde yanıtlanması çok önemlidir. Anketimize zaman ayırdığınız için teşekkür ederiz.

*** Köpeğiniz ile en çok ilgilenen (beslenme/bakım/oyun) kişinin formu doldurması önem arz etmektedir.

* Zorunlu soruları belirtir

Adsız Bölüm

1. Ad-Soyad *

2. E-posta *

Köpeğiniz ile İlgili Genel Bilgiler

3. Köpeğinizin İsmi *

4. Köpeğinizin Yaşı *

5. Köpeğinizin Irkı *

6. Köpeğinizin Cinsiyeti *

7. Köpeğinizin yaklaşık kilosu: *

8. Köpeğiniz kısırlaştırma operasyonu geçirdi mi? *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ Evet

☐ Hayır

9. Köpeğinizin beslenme rutinini oluşturan mama/mamaların içeriği nedir? *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ Kuru Mama

☐ Yaş Mama

☐ Çoğunlukla kuru mama, ara sıra yaş mama

☐ Çiğ besleme (Raw Diyet)

☐ Diğer: _____

10. Köpeğinizin en son kullandığı mamanın/mamaların ismi (markası) nedir? *

Yakın zamanda (son 6 ay içinde) mama değişikliği yaptıysanız lütfen belirtiniz.

11. Köpeğinizi sahiplendiğinizde kaç yaşındaydı/aylıktı/haftalıktı? *

12. Evinizde köpeğiniz dışında yaşayan başka evcil hayvan/hayvanlar var mı? Eğer var ise lütfen kısaca bilgi veriniz.

13. Köpeğinize en son ne zaman karma aşı uygulandı? *

(Lütfen gün-ay-yıl olacak şekilde tarih ile belirtiniz.)

14. Köpeğinize en son ne zaman kuduz aşısı uygulandı? *

(Lütfen gün-ay-yıl olacak şekilde tarih ile belirtiniz.)

15. Köpeğinize en son ne zaman iç-dış parazit uygulaması yapıldı?

(Lütfen gün-ay-yıl olacak şekilde tarih ile belirtiniz.)

16. Köpeğinizin bu zamana kadar yaşadığı sağlık problem(ler)ini lütfen belirtiniz.

Lütfen bu problem(ler)i belirtirken, problem(ler)in ortaya çıktığı yaş(lar)ı da belirtiniz.

17. Köpeğiniz daha önce hiç antibiyotik tedavisi uygulandı mı? *

Yalnızca bir şıkki işaretleyin.

- ☐ Evet
☐ Hayır

18. Cevabınız evet ise; antibiyotik tedavisinin uygulandığı zamanı belirtebilir misiniz?

19. Köpeğiniz daha önce hiç probiyotik takviyesi verildi mi? *

Yalnızca bir şıkki işaretleyin.

- ☐ Evet
☐ Hayır

20. Cevabınız evet ise; probiyotik takviyesi verdiğiniz zamanı ve hangi probiyotiği kullandığınızı belirtebilir misiniz?

21. Köpeğinizde işitme ve/veya görme kaybı mevcut mu? *

Yalnızca bir şıkki işaretleyin.

- ☐ İşitme kaybı mevcut
☐ Görme kaybı mevcut
☐ Hem işitme hem de görme kaybı mevcut
☐ Bilinen herhangi bir işitme ve/veya görme kaybı yok

22. Köpeğinizde herhangi bir ağrı durumunun olduğunu düşünüyor musunuz? *

Yalnızca bir şıkki işaretleyin.

- ☐ Evet
☐ Hayır

23. Cevabınız evet ise; köpeğinizin ağrı durumu sizce hangi anatomik bölgeden kaynaklanıyor olabilir?

Bir üst soruya cevabınız evet ise, lütfen bu soruyu da cevaplayınız. Bir üst soruya cevabınız hayır ise, bu soruyu atlayabilirsiniz. Birden fazla şıkki işaretleyebilirsiniz.

Yalnızca bir şıkki işaretleyin.

- ☐ Baş bölgesi - Kulaklar
☐ Ağız
☐ Boyun
☐ Sırt
☐ Kalça
☐ Bacaklar
☐ Eklem Bölgeleri
☐ Karın Bölgesi
☐ Diğer: _____

Heyecanlanma

Bazı köpekler, bulundukları ortamdaki ani veya potansiyel olarak heyecan ve rahatsızlık verici olaylara nispeten daha az tepki gösterirken, bazıları en küçük yenilikte bile oldukça fazla heyecanlanır. Lütfen aşağıdaki skalada belirtildiği gibi köpeğiniz için en uygun olan rakamı (0: sakin, 4: aşırı heyecanlı) seçerek köpeğinizin her bir durum için ne derece heyecanlandığını belirtiniz.

HAFİF-ORTA DERECEDE HEYECANLI	
SAKİN:	0 1 2 3 4
Çok az veya hiç reaksiyon göstermez	AŞIRI HEYECANLI: Aşırı tepki gösterir, sakinleşmekte zorlanır

24. Kısa bir aradan sonra siz veya ailenin diğer üyeleri eve geldiğinde *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0	☐
1	☐
2	☐
3	☐
4	☐

25. Kapı çaldığında *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0	☐
1	☐
2	☐
3	☐
4	☐

26. Yürüyüşe çıkmadan hemen önce *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0	☐
1	☐
2	☐
3	☐
4	☐

27. Arabayla gezintiye çıkmadan hemen önce. *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

28. Köpeğinizin heyecanlandığı başka durum/durumlar var mı? Eğer varsa, lütfen kısaca açıklayınız:

Agresyon

Bazı köpekler zaman zaman agresif davranışlar (havlama, hırlama, diş gösterme, ısırmaya çalışma) sergileyebilirler. Lütfen aşağıdaki skalada belirtildiği gibi köpeğiniz için en uygun olan rakamı (0: agresyon göstermiyor, 4: şiddetli agresyon gösteriyor) seçerek köpeğinizin her bir durum için ne derece agresif bir davranış sergileme eğilimi olduğunu belirtiniz.

ORTA DERECELİ AGRESYON	
Hırlama-havlama, diş gösterme	
AGRESYON GÖSTERMİYOR: 0	1 2 3 4
Agresyon belirtisi yok	ŞİDDETLİ AGRESYON GÖSTERİYOR: Isırma ve/veya ısırmaya çalışma

29. Köpeğiniz tasmayla yürürken/egzersiz yaparken yabancı bir kişi doğrudan ona yaklaştığında *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

30. Köpeğinizin oyuncakları aile üyeleri tarafından önünden alındığında *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

—

31. Köpeğiniz yemek yerken aile üyeleri doğrudan ona doğru yaklaştığında *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

—

32. Postacı veya başka teslimat görevlileri eve doğru yaklaştığında *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

—

33. Köpeğinizin maması aile üyeleri tarafından önünden alındığında *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

—

34. Köpeğiniz tasmayla yürürken/egzersiz yaparken daha önce tanımadığı bir köpek doğrudan ona yaklaştığında *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

35. Köpeğiniz dışarda veya evinizin bahçesindeyken yabancı bir kişi evinizin önünden yürüyerek geçerken *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

36. Köpeğinizin tanımadığı bir köpek, köpeğinize karşı havladığında, hırladığında veya hamle yaptığında *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

37. Köpeğinizin daha önceden tanıdığı ev köpeği, yemek yerken köpeğinize doğru yaklaştığında

Köpeğiniz ev ortamında başka köpeklerle birlikte olmuyorsa bu soruyu boş bırakınız.

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

38. Köpeğinizin daha önceden tanıdığı ev köpeği, köpeğinizin en sevdiği oyuncak, kemik, vb. nesnelerle oynarken ona doğru yaklaştığında

Köpeğiniz ev ortamında başka köpeklerle birlikte almuyorsa bu soruyu boş bırakınız.

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

—

39. Köpeğinizin agresyon gösterdiği başka durum/durumlar var mı? Eğer varsa, lütfen kısaca açıklayınız:

Korku ve Anksiyete

Bazı köpekler zaman zaman belirli seslere, nesnelere, kişilere veya durumlara maruz kaldıklarında korku veya anksiyete belirtileri (göz temasından kaçınmak, kuyruğun bacakların arasına sıkışması, inlemek ve sızlanmak, donup kalmak, titremek, kaçmaya veya saklanmaya çalışmak) gösterebilir. Lütfen aşağıdaki skalada belirtildiği gibi köpeğiniz için en uygun olan rakamı (0: köpeğinizin korkmaması, 4: şiddetli derecede korkması) seçerek köpeğinizin her bir durum için ne derece korkuya ilişkin bir davranış sergileme eğilimi olduğunu belirtiniz.

Hafif-Orta Dereceli Korku/Anksiyete	
Bu durumdan korkmuyor:	0 1 2 3 4
Korku belirtisi yok	Bu durumdan şiddetli derecede korkuyor:
	Siner, geri çekilir veya saklanır

40. Evden uzakta olduğunuzda yabancı bir kişi doğrudan size doğru yaklaştığında *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

—

41. Köpeğinizin ani ve/veya yüksek seslere karşı (elektrik süpürgesi, araba-motor sesi, yere düşen nesneler, gök gürültüsü vb.) tepkisi *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

42. Yabancı bir kişi köpeğinize dokunduğunda veya onu sevmeye çalıştığında *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

43. Köpeğinizin yürürken ona yabancı gelen veya garip nesnelere karşı (plastik çöp poşetleri, yaprak, yerdeki çöpler, vb.) tepkisi *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

44. Köpeğinizin tanımadığı-yabancı bir köpek, ona doğrudan yaklaştığında *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

45. Köpeğiniz ilk defa yabancı olduğu durumlarla karşılaştığında (ilk araba gezisi, ilk defa asansöre binmek, veteriner kliniğine ilk defa gidiş, vb.) *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

46. Köpeğinizin tanımadığı bir köpek, köpeğinize karşı havladığında, hırladığında veya hamle yaptığı anda *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

47. Köpeğinizin ailenin bir üyesi tarafından tırnaklarının kesilmesi *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

48. Köpeğinizin ailenin bir üyesi tarafından taranması veya yıkanması *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

49. Köpeğinizin korktuğu ve/veya kaygılandığı başka durum/durumlar var mı? Eğer varsa, lütfen kısaca açıklayınız:

Ayrılık ile İlişkili Davranış

Bazı köpekler, yalnızca kısa süre için bile olsa, yalnız bırakıldığında anksiyete ile ilişkili davranış belirtileri gösterebilir. Yakın geçmişte baktığınızda, **köpeğinizin yalnız kaldığında veya yalnız bırakıldığında anksiyete ile ilgili aşağıdaki davranış belirtilerini ne sıklıkla gösterdiğini lütfen belirtiniz.**



50. Huzursuzluk, aşırı uyanılmış bir şekilde davranma, volta atıp durma (sürekli hareket halinde olma) *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

51. Ağlamaya benzer inleme, mızızlanma ve/veya havlama *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

52. Kapı, zemin, pencere, perde vb. yerleri çiğnemeye çalışma, kazma veya egeleme *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

53. Köpeğinizin yalnız kaldığında gösterdiği başka davranış belirtisi/belirtileri var mı? Eğer varsa, lütfen kısaca açıklayınız:

Eğitim

Bazı köpekler, diğerlerine kıyasla daha kolay eğitilebilirler. Yakın geçmişte baktığınızda, köpeğiniz için uygun olan rakamı (0-4 arası) seçerek köpeğinizin her bir durum için ne derece eğitilebilir olduğunu belirtiniz.



54. "Otur" komutuna hemen uyar *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

55. "Bekle" komutuna hemen uyar *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

56. Köpeğinizin kolaylıkla ilginç yerler, sesler veya kokulardan dolayı dikkati dağılır *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

57. Yeni komutlar veya görevler öğrenme konusunda yavaştır *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

Diğer Problemler

Köpekler, bu anketle ele alınanlara ek olarak çeşitli davranış problemleri sergileyebilir. Yakın geçmişte baktığınızda, köpeğinizin aşağıdaki davranışlardan her birini ne sıklıkta gösterdiğini belirtiniz.



58. Fırsat bulduğunda kuşları kovalar *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

59. Fırsat bulduğunda kedileri kovalar *

Yalnızca bir şıkko işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

60. Fırsat bulduğunda evden ya da evin bahçesinden kaçır veya kaçmaya çalışır *

Yalnızca bir şıkko işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

61. Uygun olmayan nesneleri/objeleri çiğner *

Yalnızca bir şıkko işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

62. Tasmaı takılı olduğunda tasmanın kayışını oldukça sert bir şekilde çeker *

Yalnızca bir şıkko işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

63. Evinizdeki eşyalara / mobilyalara idrar yapar *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

☐

64. Gün boyu veya gece yalnız kaldığında idrarını yapar *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

☐

65. Gün boyu veya gece yalnız kaldığında dışkısını yapar *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

☐

66. Hiperaktif ve huzursuzdur, sakinleşme konusunda problem yaşar *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

☐

67. Oyuncudur, karakteri yavru bir köpeğe benzer, gürültücüdür *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

68. Aktif ve enerjiktir, sürekli hareket halindedir *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

69. Kendi kuyruğunu kovalar *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

70. Endişelendiğinde veya heyecanlandığında ısrarla sürekli bir şekilde havlar *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

71. Kendi dışkısını ve/veya diğer hayvanların dışkısını yer *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

☐

72. Dikkatli bir şekilde gözlerini bir noktaya dikerek sanki gözle görülmeyen bir şey varmış gibi ısrarla bakar *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

☐

73. Gölgele, ışıklı noktaları vb. kovalar / takip eder *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

☐

74. Kendisini aşırı derecede yalar *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

☐

75. Köpeğinizin yukarıdaki problemler dışında sergilediği başka davranış/davranışlar var mı? Eğer varsa, lütfen kısaca açıklayınız:

1. Köpeklerde Bilişsel Fonksiyon Bozukluğu Değerlendirme Anketi - DISHAA

Köpeklerde şekillenen "**Bilişsel Fonksiyon Bozukluğu Sendromu (CCDS)**", insanlarda Alzheimer hastalığına benzer şekilde, genellikle yaşlanmayla birlikte ortaya çıkan ve ilerleyici bilişsel bozuklukla karakterize, geri dönüşü olmayan bir beyin dejenerasyonudur. Bilişsel fonksiyon bozukluğu sendromunun başlangıcı yavaştır, yönetilmesi zor olabilir ve 8 yaş ve üzeri köpeklerle yapılan çalışmalara göre köpeklerin %14'ünü etkilemektedir. Bir köpeğe bilişsel fonksiyon bozukluğu sendromu teşhisi konulabilmesi için, sahiplerinin köpeklerinin belirli davranışları sergilediğini gözlemlemesi gerekmektedir.

Oryantasyon Bozukluğu

Bu anket formunun her bir aşamasında yakın geçmişte, köpeğinizin aşağıdaki davranışlardan her birini hangi ölçüde (0: Böyle bir davranış sergilemiyor, 3: Bu davranış şiddetli bir şekilde mevcut) gösterdiğini belirtmeniz istenmektedir.

*** Lütfen her bir soru için özellikle 7 yaş ve sonrasında ortaya çıkan veya ilerleyen belirtileri tanımlayınız.



76. Bir yerlere sıkışır, nesnelerin etrafından dolanmakta güçlük çeker, kapının menteşe tarafından yürümeye çalışır *

Sadece bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

—

77. İfadesiz bir şekilde gözlerini dikerek duvara, yere veya boşluğa bakar *

Sadece bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

—

78. Önceden tanıdığı insanları/evcil hayvanları tanımaz *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐

79. Evin içinde veya bahçede/dışında kaybolur *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐

80. Görsel (görüntü) veya işitsel (sesler) uyarılara karşı daha az tepki verir *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐

Sosyal Etkileşim

Bu anket formunun her bir aşamasında yakın geçmişte, köpeğinizin aşağıdaki davranışlardan her birini hangi ölçüde (0: Böyle bir davranış sergilemiyor, 3: Bu davranış şiddetli bir şekilde mevcut) gösterdiğini belirtmeniz istenmektedir.

*** Lütfen her bir soru için özellikle 7 yaş ve sonrasında ortaya çıkan veya ilerleyen belirtileri tanımlayınız.



81. Misafirlere, aile üyelerine ve/veya diğer hayvanlara karşı daha sinirli/korkak/agresif *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

82. Ona doğru yaklaşmanıza, onunla selamlaşmanıza veya onunla ilgilenmenize/sevmenize karşı ilgisinde azalma *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

Uyku-Uyanıklık Döngüsü

Bu anket formunun her bir aşamasında yakın geçmişte, köpeğinizin aşağıdaki davranışlardan her birini hangi ölçüde (0: Böyle bir davranış sergilemiyor, 3: Bu davranış şiddetli bir şekilde mevcut) gösterdiğini belirtmeniz istenmektedir.

*** Lütfen her bir soru için özellikle 7 yaş ve sonrasında ortaya çıkan veya ilerleyen belirtileri tanımlayınız.



83. İleri geri hareket halinde (volta atıyor)/huzursuz/az uyuyor/geceleri uyanıyor *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

84. Geceleri vokalizasyon/ses çıkarıyor *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

Ev İçerisine Tuvaletini Yapma, Öğrenme ve Bellek

Bu anket formunun her bir aşamasında yakın geçmişte, köpeğinizin aşağıdaki davranışlardan her birini hangi ölçüde (0: Böyle bir davranış sergilemiyor, 3: Bu davranış şiddetli bir şekilde mevcut) gösterdiğini belirtmeniz istenmektedir.

***** Lütfen her bir soru için özellikle 7 yaş ve sonrasında ortaya çıkan veya ilerleyen belirtileri tanımlayınız.**



85. Yeni komutları öğrenme veya daha önceden öğrenmiş olduğu komutlara/kendi ismine yanıt verme yeteneğinde azalma *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

86. Evin içerisine idrarını yapma davranışında artış ve idrarını yapmak için dışarı çıkma sinyallerinde azalma mevcut *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

87. Evin içersine dışkısını yapma davranışında artış ve dışkısını yapmak için dışarı çıkma sinyallerinde azalma mevcut *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

88. Köpeğinizin dikkatini çekmekte zorlanma/artan dikkat dağınıklığı/odaklanmada azalma *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

Aktivite

Bu anket formunun her bir aşamasında yakın geçmişte, köpeğinizin aşağıdaki davranışlardan her birini hangi ölçüde (0: Böyle bir davranış sergilemiyor; 3: Bu davranış şiddetli bir şekilde mevcut) gösterdiğini belirtmeniz istenmektedir.

***** Lütfen her bir soru için özellikle 7 yaş ve sonrasında ortaya çıkan veya ilerleyen belirtileri tanımlayınız.**



89. Oyuncak, aile üyeleri ve/veya diğer evcil hayvanlar ile keşif veya oyun oynama aktivitesinde azalma *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

90. Amaçsızca ileri geri hareket etme ve/veya dolaşmayı içeren aktivitede artış *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐

91. Tekrarlı davranışlardan biri olan kendi etrafında, odanın çevresinde, belirli bir alan içinde daire çizme hareketinin gözlenmesi gibi tekrarlayan davranış davranış ___ çiğnemek ___ yalamak ___ yıldızlara bakmak ___ *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐

92. Tekrarlı davranışlardan biri olan çiğneme davranışının gözlenmesi *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐

93. Tekrarlı davranışlardan biri olan yalama davranışının gözlenmesi *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐

94. Tekrarlı davranışlardan biri olan ve başını-boynunu yukarı doğru kaldırarak ardından tavana veya gökyüzüne bakma davranışı olarak ifade edilen "yıldızlara bakma - stargazing" davranışının gözlenmesi *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

Anksiyete

Bu anket formunun her bir aşamasında yakın geçmişte, köpeğinizin aşağıdaki davranışlardan her birini hangi ölçüde (0: Böyle bir davranış sergilemiyor, 3: Bu davranış şiddetli bir şekilde mevcut) gösterdiğini belirtmeniz istenmektedir.

*** Lütfen her bir soru için özellikle 7 yaş ve sonrasında ortaya çıkan veya ilerleyen belirtileri tanımlayınız.



95. Sizin yanınızdan ayrıldığında artan kaygı *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

96. Görsel (görüntü) veya işitsel (sesler) uyaranlara karşı daha tepkili/korkak *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

97. Mekanlara/konumlara karşı artan korku (yeni ortamlara girmek/dışarı çıkmak) *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

2. Köpeklerde Bilişsel Fonksiyon Bozukluğu Değerlendirme Anketi - CCDRS

Bu bölüm 5. bölüme benzer şekilde köpeklerde bilişsel fonksiyon bozukluğunu teşhis etmek için rutin olarak kullanılan bir ölçektir. Bu bölümde yakın geçmişte, köpeğinizin aşağıdaki davranışlardan her birini hangi sıklıkta (1: asla, 5: > günde 1 kez) gösterdiğini belirtmeniz istenmektedir.

> günde 1 kez) gösterdiğini belirtmeniz istenmektedir.

1 2 3 4 5

Asla Ayda 1 kez Haftada 1 kez Günde 1 kez > Günde 1 kez

98. Köpeğiniz ne sıklıkta ileri geri hareket ediyor, daireler çizerek dolaşıyor ve/veya herhangi bir amacı olmadan dolaşıyor? *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

☐ 5

99. Köpeğiniz ne sıklıkla duvara veya zemine boş bir şekilde bakıyor? *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

5 ☐

—

100. Köpeğiniz ne sıklıkla yürürken herhangi bir nesneye/objeye takılıyor ve onun etrafından dolanarak geçmekte zorlanıyor? *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

5 ☐

—

101. Köpeğiniz ne sıklıkla daha önceden tanıdığı insanları ve/veya evcil hayvanları tanımakta başarısız oluyor? *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

5 ☐

—

102. Köpeğiniz ne sıklıkla duvara ve/veya kapılara doğru yürüyor? *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

5 ☐

—

103. Köpeğiniz ne sıklıkla onu severken uzaklaşıyor ve/veya sevimliden kaçınıyor? *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

- 1 ☐
- 2 ☐
- 3 ☐
- 4 ☐
- 5 ☐



104. Köpeğiniz ne sıklıkla yere düşen yiyecekleri/mamayı bulmakta zorlanıyor? *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

- 1 ☐
- 2 ☐
- 3 ☐
- 4 ☐
- 5 ☐



105. Köpeğiniz 6 ay öncesiyle karşılaştırıldığında, artık bir ileri bir geri yürüyor-volta atıyor, daireler çiziyor ve/veya herhangi bir amacı olmadan dolaşıyor mu? *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

☐ 5

106. Köpeğiniz 6 ay öncesiyle karşılaştırıldığında, artık duvara ve/veya yere doğru boş ve ifadesiz bir şekilde bakıyor mu? *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

☐ 5

107. Köpeğiniz 6 ay öncesiyle karşılaştırıldığında, daha önce temiz tuttuğu bir alana idrar ve/veya dışkı yapıyor mu? *

Köpeğiniz daha önce hiç farklı bir yere idrarını-dışkısını yapmadıysa, 'aynı' seçeneğini işaretleyiniz.

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

☐ 5

108. Köpeğiniz 6 ay öncesiyle karşılaştırıldığında, yere düşen yiyecekleri-mamayı bulmakta zorlanıyor mu? *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

☐ 5

109. Köpeğiniz 6 ay öncesi ile karşılaştırdığınızda, tanıdığı insanları ve/veya evcil hayvanları tanımakta başarısız oluyor mu? *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

5 ☐



110. Köpeğinizi 6 ay öncesi ile karşılaştırdığınızda, aktif geçirdiği süre *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

5 ☐

Yaşam Kalitesi Ölçeği - QOL

Yaşam kalitesi, canlının fiziksel ve psikolojik sağlığından, fiziksel ve sosyal çevresinden ve çevre ile etkileşim yeteneğinden duyduğu memnuniyet olarak tanımlanmaktadır. Yaşam kalitesi (QOL), psikometrik ölçeklerle değerlendirilebilir ve evcil hayvanların davranışları ile gözlemlenebilen refah düzeyini yansıtmaktadır. Bu amaçla, köpeğinizin aşağıdaki davranışların her birini hangi sıklıkta (0: Asla, 4: Neredeyse her zaman) gösterdiğini belirtmeniz istenmektedir.

1. Mutluluk



111. Köpeğim oyun oynamak istiyor *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

112. Köpeğim benim varlığıma tepki veriyor *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

113. Köpeğim hayattan keyif alıyor *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

2. Mental Durum



114. Köpeğimin kötü geçen günlerinden daha çok iyi geçen günleri var *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

115. Köpeğim genellikle uyur, gün içerisinde uyanık olduğu zaman daha azdır *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

116. Köpeğim durgun ve/veya depresif görünüyor, tetikte değil *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

3. Ağrı



117. Köpeğim acı çekiyor *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

118. Köpeğim dinlenirken bile hızlı ve sık nefes alıp veriyor *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

119. Köpeğim ara sıra sallanıyor ve/veya titriyor *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

4. İştah



120. Köpeğim normal-her zamanki kadar miktarda mama yiyor *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

121. Köpeğimin midesi bulanıyor ve/veya kusuyor *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

122. Köpeğim ödül maması/atıştırılmalık bir şeyler yer *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

5. Hijyen



123. Köpeğim kendisini temiz tutar *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

—

124. Köpeğimde kötü bir koku var ve/veya deri kaşıntısı-hassasiyeti var *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

—

125. Köpeğimin tüyleri yağlı, keçeleşmiş, pürüzlü görünüyor *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

—

6. Sıvı Dengesi



126. Köpeğim yeterli miktarda su içiyor *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

127. Köpeğimin ishali var *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

128. Köpeğim normal miktarda idrar yapıyor *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

0 ☐

1 ☐

2 ☐

3 ☐

4 ☐

7. Hareketlilik



129. Köpeğim normal bir şekilde hareket ediyor/yürüyor *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

☐

130. Köpeğim bütün gün tek bir yerde yatıyor *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

☐

131. Köpeğim geçmişte olduğu kadar aktif *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ 0

☐ 1

☐ 2

☐ 3

☐ 4

☐

Kronik Ağrı Değerlendirmesi - HCPI

Bu bölüm, köpeğinizdeki kronik ağrı durumunu değerlendirmek amacıyla oluşturulmuştur. Lütfen aşağıda belirtilen her bir durum için köpeğinizin gösterdiği davranışsal yanıtı en uygun olan seçeneği işaretleyiniz.

132. Köpeğinizin genel olarak tutumunu ve/veya ruh halini değerlendiriniz *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

☐ Aşırı Tetikte

☐ Tetikte

☐ Ne tetikte ne de tam olarak ilgisiz

☐ İlgisiz

☐ Aşırı ilgisiz/halsiz

133. Köpeğinizin oyuna veya etkileşime katılma isteğini değerlendiriniz *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

- ☐ Aşırı istekli
☐ İstekli
☐ İsteksiz
☐ Çok isteksiz
☐ Katılım göstermiyor veya hiç etkileşime girmiyor

134. Köpeğinizin vokalizasyon (ses çıkarma) ve/veya huzursuz-rahatsız olduğu davranış (sızlanma, homurdanma, havlama veya olağandışı yalama) sıklığını değerlendiriniz *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

- ☐ Asla
☐ Neredeyse hiç
☐ Ara sıra
☐ Sık sık
☐ Çok sık

135. Köpeğinizin yürümeye karşı olan isteğini değerlendiriniz *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

- ☐ Aşırı istekli
☐ İstekli
☐ İsteksiz
☐ Çok isteksiz
☐ Neredeyse hiç yürümek istemiyor

136. Köpeğinizin merdivenlerden yukarı ve/veya aşağı yürüme becerisini ve/veya isteğini değerlendiriniz *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

- ☐ Çok istekli ve merdivenlerden inip çıkabiliyor
☐ İstekli ve merdivenlerden inip çıkabiliyor
☐ İsteksiz
☐ Çok isteksiz
☐ Neredeyse hiç merdivenlerden inip çıkmıyor

137. Köpeğinizin koşma becerisini ve/veya isteğini değerlendiriniz *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

- ☐ Çok istekli ve koşabiliyor
☐ İstekli ve koşabiliyor
☐ İsteksiz
☐ Çok isteksiz
☐ Neredeyse hiç koşmuyor

138. Köpeğinizin atlama-zıplama (yatağa, kanepeye atlama, arabaya binme vb.) becerisini ve/veya isteğini değerlendiriniz *

Yalnızca bir şıkla işaretleyin.

- ☐ Çok istekli ve atlayabiliyor
☐ İstekli ve atlayabiliyor
☐ İsteksiz
☐ Çok isteksiz
☐ Neredeyse hiç atlamıyor

139. Köpeğiniz yere uzanırken güçlük çekiyor mu? *

Yalnızca bir şıkkı işaretleyin.

- ☐ Çok kolay bir şekilde uzanıyor
- ☐ Kolay bir şekilde uzanıyor
- ☐ Ne çok kolay ne de çok zor bir şekilde uzanıyor
- ☐ Uzanırken zorlanıyor
- ☐ Uzanırken çok zorlanıyor

140. Köpeğiniz yatar pozisyonundan ayağa kalkarken zorlanıyor mu? *

Yalnızca bir şıkkı işaretleyin.

- ☐ Çok kolay bir şekilde ayağa kalkıyor
- ☐ Kolay bir şekilde ayağa kalkıyor
- ☐ Ne çok kolay ne de çok zor bir şekilde ayağa kalkıyor
- ☐ Ayağa kalkarken zorlanıyor
- ☐ Ayağa kalkarken çok zorlanıyor

141. Uzun bir dinlenme periyodundan sonra köpeğinizin hareket ederken zorlanıp zorlanmadığını değerlendiriniz *

Yalnızca bir şıkkı işaretleyin.

- ☐ Uzun bir dinlenmenin ardından çok kolay hareket edebiliyor
- ☐ Uzun bir dinlenmenin ardından kolay hareket edebiliyor
- ☐ Uzun bir dinlenmenin ardından ne çok kolay ne de zor hareket edebiliyor
- ☐ Uzun bir dinlenmenin ardından hareket ederken zorlanıyor
- ☐ Uzun bir dinlenmenin ardından hareket ederken çok zorlanıyor

142. Egzersiz/yürüyüş sırasında ve/veya sonrasında köpeğinizin hareket ederken zorlanıp zorlanmadığını (yoruluyor, ayaklarını sürüklüyor, uzanıyor) değerlendiriniz *

Yalnızca bir şıkkı işaretleyin.

- ☐ Egzersiz/yürüyüş sonrası çok kolay hareket edebiliyor
- ☐ Egzersiz/yürüyüş sonrası kolay hareket edebiliyor
- ☐ Egzersiz/yürüyüş sonrası ne çok kolay ne de zor hareket edebiliyor
- ☐ Egzersiz/yürüyüş sonrası hareket ederken zorlanıyor
- ☐ Egzersiz/yürüyüş sonrası hareket ederken çok zorlanıyor

Bu içerik Google tarafından oluşturulmamış veya onaylanmamıştır.

Google Formlar