



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**BABESİOSİSLİ KÖPEKLERDE TİYOL-DİSÜLFİT DENGESİNİN,
TOTAL OKSİDAN-ANTİOKSİDAN VE İSKEMİ MODİFİYE
ALBÜMİN SEVİYELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hemşire Mustafa TARHAN
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Yeter DEĞER

2. DANIŞMAN
Doç. Dr. Bekir OĞUZ

VAN-2022

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BABESİOSİSLİ KÖPEKLERDE TİYOL-DİSÜLFİT DENGESİNİN,
TOTAL OKSİDAN-ANTİOKSİDAN VE İSKEMİ MODİFİYE
ALBÜMİN SEVİYELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hemşire Mustafa TARHAN
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Yeter DEĞER

2. DANIŞMAN
Doç. Dr. Bekir OĞUZ

VAN-2022

Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2022-9868 nolu proje ile desteklenmiştir.

ETİK BEYAN

T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*Babesiosisli Köpeklerde Tiyol-Disülfid Dengesinin, Total Oksidan-Antioksidan ve İskemi Modifiye Albümin Seviyelerinin Araştırılması*” başlıklı tezim; 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. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Mustafa TARHAN

Tarih: 21/11/2022

İmza:

TEŞEKKÜR

Çalışmanın planlanması ve yürütülmesinde yol gösteren, ilgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Danışman Hocalarım Prof. Dr. Yeter DEĞER'e ve Doç. Dr. Bekir OĞUZ'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım. Yüksek Lisans eğitimim sırasındaki değerli katkılarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Semiha DEDE'ye ve Biyokimya Anabilim Dalı'nın diğer öğretim üyesi hocalarına teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Tez çalışmamın laboratuvar analizleri aşamasındaki katkılarından dolayı Doç. Dr. Uğur ÖZDEK'e teşekkür ederim. Bu tezin gerçekleşmesi için maddi destek sağlayan Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bugünlere gelmemi sağlayan, maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Tarhan M. Babesiosisli Köpeklerde Tiyo1-Disülfıt Dengesinin, Total Oksidan-Antioksidan ve İskemi Modifiye Albümin Seviyelerinin Araştırılması. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2022. Bu çalışma babesiosisli köpeklerde oksidatif stresin değerlendirilmesinde total antioksidan kapasite (TAK), total oksidan kapasite (TOK), oksidatif stres indeksi (OSİ), tiyo1/disülfıt denge (TDD), albümin (ALB) ve iskemi modifiye albümin (İMA) parametrelerinin tanısal etkinliklerini ortaya koymak için planlandı. Çalışmada klinik ve parazitolojik (ELISA) olarak babesiosis tanısı konulan 7 adet köpek babesiosisli grubu, 7 adet sağlıklı köpekte kontrol grubunu oluşturdu. Her iki gruptan kan örnekleri alındı. Kan serumlarında TAK ve TOK seviyeleri ticari kit kullanılarak, total tiyo1 (TT) ve nativ tiyo1 (NT) seviyeleri metot kullanılarak ELISA cihazında ölçüldü. İMA seviyesi metot kullanılarak spektrofotometre cihazında ölçüldü. ALB seviyesi ticari kit kullanılarak modüler oto analizör cihazında ölçüldü. OSİ ve disülfıt (Ds) seviyeleri formül kullanılarak hesaplandı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında babesiosisli grupta istatistiki olarak anlamlı olacak şekilde TAK ve ALB seviyelerinin azaldığı, bununla birlikte TOK ve OSİ seviyelerinin arttığı tespit edildi ($p<0,05$). NT, TT, Ds ve İMA seviyeleri ile NT/TT, Ds/TT ve Ds/NT oranları açısından gruplar arasında fark olmadığı belirlendi ($p>0,05$). TAK ile OSİ arasında ve Ds/NT ile NT, TT ve NT/TT arasında anlamlı negatif korelasyon olduğu bulundu (sırasıyla $p<0,05$; $p<0,001$). NT ile TT ve NT/TT arasında ve TT ile NT/TT arasında anlamlı pozitif korelasyon olduğu belirlendi ($p<0,001$). TAK, TOK, OSİ ve ALB'nin ROC eğrisi altında kalan alanları sırasıyla 0,918, 0,796, 0,980 ve 1 olarak tespit edildi ($p<0,05$). Elde edilen sonuçlar babesiosisli köpeklerde artan oksidatif stresi değerlendirmede TAK, TOK, OSİ ve ALB'nin tanısal performansa sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Babesiosis, İskemi Modifiye Albümin, Köpek, Oksidatif Stres, Tiyo1 Disülfıt Denge

ABSTRACT

Tarhan M. The Investigation of Thiol Disulfide Homeostasis, Total Oxidant-Antioxidant Status and Ischemia-Modified Albumin Levels in Dogs with Babesiosis. Van Yüzüncü Yıl University, Institute of Health Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Master Thesis, Van, 2022. This study aimed to investigate the diagnostic value of total antioxidant capacity (TAC), total oxidant capacity (TOC), oxidative stress index (OSI), thiol/disulfide homeostasis (TDH), ischemia-modified albumin (IMA) and albumin (ALB) levels in evaluating oxidative stress in dogs with babesiosis. The babesiosis group included the 7 dogs clinically and parasitologically (ELISA) diagnosed with babesiosis while 7 healthy dogs were assigned as the control group. Blood samples were taken from both groups. In the blood serums, commercial kit was used to determine the levels TAC with TOC and method was used to determine levels total thiol (TT) with native thiol (NT) in ELISA device. IMA level was measured in spectrophotometer device by using of the method. ALB level was measured on modular auto analyzer device using commercial kit. OSI and disulfide (Ds) levels were calculated using the formula. Compared with the control group, it was detected that TAC and ALB levels were significantly decreased, at the same time TOC and OSI levels were significantly increased in the babesiosis group ($p<0,05$). It was determined that there was no difference between the groups in terms of NT, TT, Ds and IMA levels and NT/TT, Ds/TT and Ds/NT ratios ($p>0,05$). A significant negative correlation was found between TAC with OSI and between Ds/NT with NT, TT and NT/TT (respectively $P<0,05$; $p<0,001$). It was determined that there was a significant positive correlation between NT with TT and NT/TT and between TT with NT/TT. The areas under the ROC curve of TAC, OSI and ALB were determined as 0,918, 0,796, 0,980 and 1 respectively ($P<0,05$). The results show that TAC, TOC, OSI, and ALB have diagnostic performance in assessing increased oxidative stress in dogs with babesiosis.

Key Words: Babesiosis, Ischemia Modified Albumin, Dog, Oxidative Stress, Thiol Disulfide Homeostasis

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Etik Beyan.....	II
Teşekkür.....	III
Özet.....	IV
Abstract.....	V
İçindekiler	VI
Simgeler ve Kısaltmalar.....	VIII
Şekiller Listesi	IX
Tablolar Listesi	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Köpeklerde Babesiosis.....	3
2.1.1. Etiyoloji, yaşam döngüsü ve patogenez.....	3
2.1.2. Klinik belirtiler	5
2.1.3. Tanı ve tedavi.....	6
2.2. Serbest Radikaller	7
2.3. Antioksidanlar.....	8
2.4. Oksidatif Stres.....	9
2.5. Total Antioksidan Kapasite (TAK).....	10
2.6. Total Oksidan Kapasite (TOK).....	10
2.7. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ).....	11
2.8. Tiyo - Disülfid Denge (TDD).....	11
2.9. Albümin (ALB).....	12
2.10. İskemi Modifiye Albümin (İMA)	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	14
3.1. Gereç	14
3.1.1. Hayvan materyali	14
3.1.2. Analizlerde kullanılan cihaz ve malzemeler	14
3.1.3. Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler	15
3.2. Yöntem.....	15

3.2.1. Kan örneklerinin alınması.....	15
3.2.2. Parazitolojik analiz	15
3.2.3. Biyokimyasal analizler	17
3.3. İstatistik Analiz	23
4. BULGULAR.....	24
TARTIŞMA VE SONUÇ	31
KAYNAKLAR	42
ÖZGEÇMİŞ	48
EKLER.....	49
Ek 1. Etik Kurul Raporu	49
Ek 2. Tez Orijinallik Raporu.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AOPP	: İleri düzey okside protein
Ds	: Disülfid
ELISA	: Enzyme-linked Immunosorbent Assay
GPX	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Glutasyon
IFAT	: İndirekt fluoresan antikor testi
İMA	: İskemi modifiye albümin
LPO	: Lipid peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit
NO	: Nitrik oksit
NT	: Nativ tiyol
OSİ	: Oksidatif stres indeksi
PUFA	: Poliansature yağ asidi
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RLB	: Reverse line blotting
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
ROC	: Receiver operating characteristic
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
TAK	: Total antioksidan kapasite
TBARS	: Tiyobarbitürik asit reaktif madde
TDD	: Tiyol/disülfid denge
TOK	: Total oksidan kapasite
TT	: Total tiyol

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. <i>Babesia canis</i> 'in mikroskopik görünümü	3
Şekil 2. Köpeklerde babesiosisin biyolojik döngüsü	4
Şekil 3. Oksidan miktarı ile antioksidan sistemler arasındaki denge	10
Şekil 4. Çalışmada kullanılan Babesia ELISA dog kitinin şematik tanımı.	16
Şekil 5. Çalışmada kullanılan Babesia ELISA dog kiti	17
Şekil 6. Babesia türleri yönünden seropozitif ve seronegatif kan serumlarının ELISA pleytindeki görünümü.	24
Şekil 7. TAK, TOK ve OSI değişkenleri ROC eğrisi grafikleri.	28
Şekil 8. NT, TT ve NT/TT değişkenleri ROC eğrisi grafikleri	29
Şekil 9. Ds, Ds/NT ve Ds/TT değişkenleri ROC eğrisi grafikleri.	29
Şekil 10. İMA ve ALB değişkenleri ROC eğrisi grafikleri.	29

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Serbest radikal kaynakları	7
Tablo 2. Antioksidanların sınıflandırılması.	9
Tablo 3. Total antioksidan kapasite (TAK) seviye ölçüm basamakları... ..	18
Tablo 4. Total oksidan kapasite (TOK) seviye ölçüm basamakları.....	19
Tablo 5. Total tiyol (TT) ve nativ tiyol (NT) seviye ölçüm basamakları... ..	21
Tablo 6. İskemi modifiye albümin (İMA) seviye ölçüm basamakları.	22
Tablo 7. Kontrol ve babesiosisli grupların TAK, TOK, OSİ, TDD parametreleri, İMA ve ALB seviyelerinin karşılaştırılması.	25
Tablo 8. Babesiosisli grubun TAK, TOK, OSİ, TDD parametreleri, İMA ve ALB seviyeleri arasındaki korelasyon analiz sonuçları.....	27
Tablo 9. Kontrol ve babesiosisli grupların TAK, TOK, OSİ, TDD parametreleri, İMA ve ALB değişkenleri için ROC eğrisi analiz sonuçları.....	28

1. GİRİŞ

Köpeklerde babesiosis vektör kenelerin yayılışına paralel olarak, tropik ve subtropik bölgelerde görülmektedir. Hastalığın hafif ya da ölümlü sonuçlanan perakut ve akut bir seyre sahip olduğu belirtilmektedir (Solano-Gallego ve Baneth, 2011). Ülkemizde yapılan moleküler çalışmalar sonucunda *B. canis*, *B. gibsoni*, *B. vogeli*, *B. rossi* ve *B. vulpes* türlerinin varlığı bildirilmiştir (Selçin ve Oğuz, 2022).

Kedi ve köpeklerde babesiosisin seyri, enfeksiyona neden olan Babesia türü başta olmak üzere hayvanın yaşı, bağışıklık sisteminin durumu ve sekonder enfeksiyonların varlığına bağlı olarak hafif anemiden çoklu organ yetersizliği sonucu ölüme kadar değişebilmektedir. Babesiosisin patogeneğinde birincil faktör hemolitik anemi olarak vurgulanmaktadır (Irwin, 2005). Parazit eritrosit içerisinde çoğaldıktan sonra, eritrositi parçalayarak serbest kalmakta, bu durum doğrudan eritrosit yıkımına neden olmaktadır. Eritrositlerin yıkımının; hemoglobinem, hemoglobüri, bilirubinemi ve bilirubinüriye yol açtığı not edilmiştir (Solano-Gallego ve Baneth, 2011). Babesia türlerinin eritrositlerde lipit peroksidasyonuna neden olan serbest radikallerin miktarını artırarak eritrositlerin parçalanmasına neden olduğu ve bu parçalanma sonucu hemolitik aneminin geliştiği bildirilmiştir (Sarma ve ark., 2015; Crnogaj ve ark., 2017).

Vucutta oksidan maddeler ve antioksidan sistemler arasındaki dengenin korunması hücre ve doku bütünlüğünün korunması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu dengenin oksidanlar lehine bozulması sonucu gelişen oksidatif stresin intra eritrositik paraziter hastalıkların patogeneğinde belirleyici bir role sahip olduğu vurgulanmaktadır (Esmaeilnejad ve ark., 2012). Total oksidan kapasite (TOK) oksidatif stresin toplam değerini ifade eder. Total antioksidan kapasite (TAK) ise antioksidan özellik gösteren tüm maddelerin toplam etkisini ortaya koyar (Gültekin ve ark., 2017). TOK seviyesinin TAK seviyesine yüzde oranı olarak ifade edilen oksidatif stres indeksi (OSİ) oksidatif stres derecesinin kapsamlı bir şekilde değerlendirmesini ortaya koyar (Pugliese ve ark., 2022).

Sülfidril (-SH) grubuna sahip olan tiyoller oksidanların oluşturacağı zararlı etkileri önleyen antioksidan savunma sistemlerindendir. Organizmada oksidatif stresin arttığı durumlarda tiyol grupları reaktif oksijen türleri (ROT) tarafından oksidasyona

uğrayarak disülfid (-S-S) bağlarını oluştururlar. Bu disülfid bağları tekrar tiyol gruplarına indirgenebilir. Bu dönüşüm dinamik tiyol-disülfid dengesinin (TDD) sürdürülmesinde önemlidir. TDD antioksidan savunma, detoksifikasyon, apoptozis, enzimatik aktivitenin düzenlenmesi ve hücrel sinyal iletiminde önemli rol oynar (Erel ve Neselioglu, 2014).

Albüminin N-terminal ucu (Co^{+2}), nikel (Ni^{+2}) ve bakır (Cu^{+2}) gibi geçiş metallerini bağlama niteliğine sahip amino asit kalıntısı ihtiva eder. Serbest radikal hasarı, enerjiye bağlı membran harabiyeti, serbest demir (Fe) ve bakıra (Cu) maruz kalma, asidoz ve hipoksi gibi durumlar albüminin N-terminal ucundaki amino asitlerde yapısal modifikasyonların oluşmasına neden olarak albüminin geçiş metallerini bağlama yeteneğini düşürür. Bu yeni oluşan albümin molekülü iskemi ile modifiye olmuş albümin (iskemi modifiye albümin - İMA) olarak isimlendirilir (Bar-Or ve ark., 2000; Lippi ve ark., 2006). İMA sadece miyokart değil farklı organları etkileyen diğer iskemi modellerinde de artan oksidatif strese bağlı olarak oluşur (Bar-Or ve ark., 2000; Lippi ve Montagnana, 2009).

Hayvan hastalıklarında artan oksidatif stres ile TDD parametreleri ve İMA arasındaki ilişkiyi araştırarak sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bununla birlikte yapılan araştırmalarda babesiosiste oksidatif stresi TDD parametreleri ve İMA düzeyinde araştırarak herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma babesiosisli köpeklerde oksidatif stresin saptanmasında total antioksidan kapasite (TAK), total oksidan kapasite (TOK), oksidatif stres indeksi (OSİ), tiyol-disülfid denge (TDD), albümin (ALB) ve iskemi modifiye albümin (İMA) parametrelerinin tanısal etkinliklerini ortaya koymak için planlandı.

2. GENEL BİLGİLER

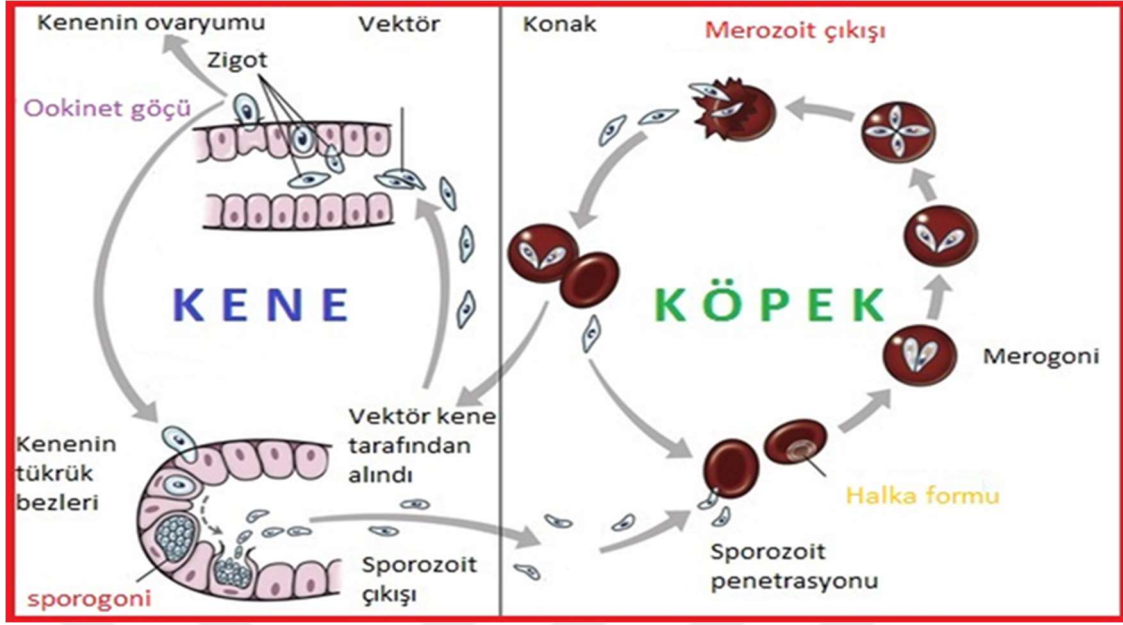
2.1. Köpeklerde Babesiosis

2.1.1. Etiyoloji, yaşam döngüsü ve patogenezi

Etkenler, *Babesia* soyuna bağlı büyük ve küçük türler olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Şimdiye kadar, köpeklerde *B. canis canis*, *B. canis vogeli*, *B. canis rossi* ve *B. gibsoni*'nin varlığı bilinmekteydi. Parazitin genetik özelliklerini ortaya koyan moleküler çalışmalar, köpeklerde yeni tür ya da alt türlerin keşfine yol açmıştır. Bunlar küçük piroplazmalar olarak *Babesia vulpes*, *Theileira annae* veya “İspanyol köpeği izolatu” şeklinde de adlandırılan *Babesia mikroti* benzeri piroplazma, *B. conradae*, *Theileria* spp. ve başlangıçta açıklananlara ek olarak henüz adlandırılmamış büyük form *Babesia* türleri gibi yeni türlerin köpeklerde moleküler yöntemlerle tespit edildiği bildirilmiştir (Solano-Gallego ve ark., 2016). Son konakta eritrositler içerisindeki *Babesia* merozoitleri, armut şeklinde veya ameboid şekilli, büyük türler 2x5 µm, küçük türler 1x3 µm büyüklüğünde ve genellikle vakuollü olup (Solano-Gallego ve Baneth, 2011), olgun merozoitler, polar halka, supelliküler mikrotubul ve roptri'ye sahipken, konoid, mikropor ve mikronemden yoksundurlar (İnci ve ark., 2010).



Şekil 1. *Babesia canis*'in mikroskopik görünümü (Mahalingaiah ve ark., 2017).



Şekil 2. Köpeklerde babesiosisin biyolojik döngüsü (Birkenheuer, 2021).

Babesia canis rossi, köpeklerin en patojen Babesia türü olup, bu türün neden olduğu enfeksiyonlar genellikle perakut ya da akut seyirli olmakta, şiddetli hemolitik aneminin yanı sıra, bir ya da fazla organda fonksiyon bozukluğu ve asit-baz dengesinde değişiklikler gözlenmektedir. Trombosit ve diğer pıhtılaşma faktörlerin azalması kanamalara yol açarken, stazis, anemi ve hemoglobin eksikliğine bağlı kanın oksijen taşıma kapasitesinin düşmesi, hayati organlarda hipoksiye neden olmaktadır. Hipoksiden en fazla beyin, böbrek ve kas dokusu etkilenmektedir. Serebral babesiosis, genellikle perakut olup, kasılma, konvulziyonlar görülmekte, şok ve daha sonra koma hali gelişmektedir (Irwin, 2005; İnci ve ark., 2010; Solano-Gallego ve Baneth, 2011; Altay ve ark., 2016).

Beyinde konjesyon ve hemorajiler ile beyin kapillar damarlarında çok sayıda enfekte eritrosit görülmektedir. Böbrek fonksiyon bozukluğu, hemoglobürik nefroza yol açmaktadır. Vasoaktif aminler ve sitokinlerin salınımı, damar permeabilite artışı ve vazodilatasyon, başta akciğerlerde olmak üzere ödemlere, vücut boşluklarında sıvı toplanmasına ve hipotansif şoka neden olmaktadır. Meydana gelen vazodilatasyon ve kan dolaşımındaki azalma, pıhtılaşma bozuklukları ile birlikte non-spesifik sistemik yangı oluşumuna öncülük etmektedir. Bağışıklık sistemine dâhil hücrelerin dalak ve karaciğerde birikmesi sonucunda, bu organlarda hipertrofi ve hiperplazi oluşmaktadır. B.

canis rossi enfeksiyonlarında mortalite %80'lere çıkabilmektedir. *B. canis canis* enfeksiyonunun patogenezi, *B. canis rossi* ile benzerlik göstermektedir. Ancak, merkezi sinir sistemi, diğer organlara göre daha az etkilenmektedir (Irwin, 2005; İnci ve ark., 2010; Solano-Gallego ve Baneth, 2011; Altay ve ark., 2016).

Babesia canis vogeli enfeksiyonu genellikle hafif seyretmekte, anemi, hafif ya da orta şiddetli olup, hayvanlarda uyuşukluk, halsizlik, dalak ve karaciğerde büyüme meydana gelirken her zaman ateş görülmediği bildirilmektedir (Irwin, 2005; İnci ve ark., 2010; Solano-Gallego ve Baneth, 2011; Altay ve ark., 2016).

2.1.2. Klinik belirtiler

Hastalığın perakut formu oldukça hızlı gelişmekte, hasta hızla hipotansif şoka girerken, mukozalar solgun, bazen siyonitik, kalp hızı artmış, nabız zayıf, hayvanda belirgin bir halsizlik ve mental deprasyon hali gözlenmekte, ateş nadiren görülmekte, genellikle hipodermi bulunmaktadır. Eritrositlerin yoğun hemolizine bağlı olarak hemoglobüri oluşmaktadır. Hipotansiyon, dokularda hipoksi ve şiddetli doku hasarına bağlı farklı organlarda fonksiyon bozuklukları oluşmakta, anüri, sinirsel belirtiler, pıhtılaşma bozuklukları ve akut solunum yetmezliği şekillenmekte, serebral form kuduz hastalığı ile karıştırılabilmektedir. Sonuçta hasta komaya girmekte ve genellikle ölüm meydana gelmektedir (Irwin, 2005; Uilenberg, 2006; İnci ve ark., 2010; Solano-Gallego ve Baneth, 2011; Altay ve ark., 2016; Solano-Gallego ve ark., 2016).

Akut formda anemi ile birlikte iştahsızlık, uyuşukluk hali, durgunluk ve kusma gibi spesifik olmayan belirtiler görülmektedir. Ayrıca enfeksiyon boyunca mukoz membranlarda konjesyon, değişken ateş, karaciğer ve dalakta büyüme, ikterus ve dehidrasyon görülen diğer belirtiler olarak tespit edilmiştir. Diş eti ve karnın ventral yüzünde peteşi ve ekimoz tarzı kanamalar görülmesinin yanında hayvanın idrarı kahverengi renkte ve kaslarda yangı gibi belirtilere de rastlanmaktadır (Irwin, 2005; Uilenberg, 2006; İnci ve ark., 2010; Solano-Gallego ve Baneth, 2011; Altay ve ark., 2016; Solano-Gallego ve ark., 2016). *B. canis canis*'in orta ila şiddetli enfeksiyonlarında karaciğer enzimlerinde (ALT, AST, ALP) yükselme, hipokalemi, hiponatremi ve hiperkloremi, hiperlaktatemi, hiperfosfatemi, hipertrigliseridemi, hipoglisemi, prerenal

ve renal azotemi gibi laboratuvar sonuçlarının görüldüğü bildirilmiştir (Solano-Gallego ve ark., 2016).

Tedavi edilen köpekler, klinik belirtiler ortadan kalksa da, hayatları boyunca hastalık etkenlerini taşımaktadırlar. Birçok köpekte subklinik enfeksiyonlar, düşük parazitemi ile devam etmektedir. Kronik enfeksiyonlarda trombosit sayısının düşüklüğü, ateş, anemi, glomerülonefrit, kilo kaybı ve lenf adenopati görülmektedir. Kedilerde *B. felis* enfeksiyonları, köpek babesiosisine göre daha hafif seyretmektedir. Klinik bulgular olarak, iştahsızlık, uyuşukluk hali, zayıflama, kabızlık, anemi, ikterus, sarı veya portakal renkli dışkılama görüldüğü bildirilmiştir (Irwin, 2005; Uilenberg, 2006; İnci ve ark., 2010; Solano-Gallego ve Baneth, 2011; Altay ve ark., 2016; Solano-Gallego ve ark., 2016).

2.1.3.Tanı ve tedavi

Babesiosisin tanısında mikroskopik, serolojik ve moleküler yöntemlerden yararlanılmaktadır. Parazitemi oranının düşük olduğu kronik enfeksiyonlarda veya taşıyıcı hayvanlarda, etkenlerin mikroskopik muayene ile teşhisi güç olmaktadır (Altay ve ark., 2016). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Reverse Line Blotting (RLB) gibi moleküler tanı yöntemleri, oldukça yüksek sensitivite ve spesifiteye sahiptirler (Birkenheuer ve ark., 2003; Irwin, 2009; Matjila ve ark., 2004). Serolojik olarak İndirekt Fluoresan Antikor Testi (IFAT) ve ELISA testleri köpek babesiosisin teşhisinde yıllardır uygulanmaktadır (Eichenberger ve ark., 2017; Vishwakarma ve Nandini, 2019).

Babesiosisin tedavisinde spesifik anti-babesial ilacın, destek ve semptomatik tedavi ile birlikte uygulanması önerilmektedir. Babesiosisin tedavisinde kullanılan başlıca bileşikler; imidocarb, diminazen, phenamidine, trypanblue, atovaquone+ azithromycin kombinasyonu şeklindedir. Bunların içinden imidocarb preparatı *Babesia canis*, *B. vogeli* ve *B. rossi* türlerinin sorumlu olduğu enfeksiyonlarda kullanılmaktadır. Bu bileşik 5-6.6 mg/kg dozda kas içi yolla uygulanmaktadır. Tedavinin etkili olabilmesi için iki hafta sonra doz tekrarlanmaktadır. Bu ilacın uygulanmasından sonra enjeksiyon yerinde ağrı, hayvanda kusma, ishal, salivasyon, kas titremesi ve huzursuzluk gibi belirtiler görülebileceği bildirilmektedir (Irwin, 2005). Atovaquone+ azithromycin kombinasyonu ise daha çok *B. gibsoni* gibi küçük *Babesia* türlerinin neden olduğu

enfeksiyonlarda etkili olduğu bildirilmektedir (Solano-Gallego ve ark., 2016; Altay ve ark., 2016; Vishwakarma ve Nandini, 2019).

2.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller bir yada daha çok ortaklanmamış elektron bulunduran atom veya moleküllerdir. Ortaklanmamış elektronlarından dolayı serbest radikaller oldukça reaktiftirler ve yarı ömürleri oldukça kısadır. Organizmada serbest radikaller hem endojen hem de eksojen kaynaklara bağlı olarak oluşabilir. Serbest radikallerin miktarındaki artış sonucu hücrenin yapı elemanları olan protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asit gibi biyomolekülerin yapısında hasar meydana gelir. Serbest radikallerin yüksek konsantrasyonlarda zararlı etkilere sahip olmalarının yanı sıra düşük yoğunluklarda yararlı etkileri bilinen bir gerçektir (Halliwell ve Gutteridge, 1999; Dündar ve Aslan, 2000).

Tablo 1. Serbest radikal kaynakları (Dündar ve Aslan, 2000).

ENDOJEN KAYNAKLAR	EKSOJEN KAYNAKLAR
-Mitekondrial ETZ -Endoplazmikredikulum -Redoks döngüsü -Araşidonik asit metabolizması -Fagositik hücreler ve endotelial hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar -Ksantin oksidaz ve NADH oksidaz gibi enzimler -Otooksidasyon reaksiyoları	- Çevresel faktörler - İlaçlar, ksenobiyotikler - Zararlı ışınlar -Sigara -UV ışınları

Biyolojik sistemlerde oluşan en önemli serbest radikaller oksijenden (O_2) köken alanlardır. Normalde O_2 mitekondride sitokrom oksidaz enzimi katalizörlüğünde dört elektron alarak suya indirgenir. Bu sırada %1-2 oranında O_2 mitokondriyal elektron transport zincirinde (ETZ) bulunan elektron taşıyıcılarından sızan elektronlar tarafından redüksiyonu oksijen radikalini oluşturur. Kaynağı oksijen olan serbet radikaller reaktif oksijen türleri (ROT) olarak adlandırılır. Başlıca ROT'lar; süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil

(OH[•]), peroksil (RO[•]), lipit peroksil (LOO[•]) ve hidroperoksil (OOH[•]) dir (Dündar ve Aslan, 2000).

Biyolojik sistemlerde azot merkezli radikallerde oluşabilmektedir. Nitrojen kaynaklı olan bu radikaller reaktif nitrojen türleri (RNT) olarak isimlendirilir. Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi katalizörlüğünde L- arjininden sentez edilen nitrik oksit (NO[•]) bu başlığın önemli bir üyesini oluşturmaktadır. NO'nun vücuttaki ROT'lar ile reaksiyona girerek güçlü bir oksidan olan peroksinitriti (ONOO[•]) oluşturur (Dündar ve Aslan, 2000; Büyüksulu ve Yiğitbaşı, 2015).

Oksijen ve nitrojen türevi olmayan radikallerde biyolojik sistemde oluşabilmektedir. Tiyol bileşikler (R-SH) geçiş metalleri ile yükseltgenerek til (RS[•]) radikalini meydana getirirler. Karbon merkezli serbest radikallerde biyolojik sistemlerde oluşabilmektedir. Bu radikaller oksijenle reaksiyona girerek peroksil radikalini oluştururlar (Tufan, 2008).

2.3. Antioksidanlar

Biyolojik organizmada serbest radikallerin oluşumunu engelleyen ve bunların oluşturduğu hasarı engelleyen savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Bu savunma mekanizmaları antioksidanlar olarak adlandırılır. Antioksidanlar; serbest radikallerin meydana gelişini engelleyerek veya meydana gelen serbest radikalleri etkisiz hale getirerek tesir ederler. Antioksidanlar tarafından oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi; toplayıcı, bastırıcı, onarıcı ve zincir kırıcı etkilerle olmaktadır. Antioksidanlar vücutta üretilir veya dışarıdan alınırlar (Karabulut ve Gülay, 2016).

Tablo 2. Antioksidanların sınıflandırılması (Karabulut ve Gülay, 2016).

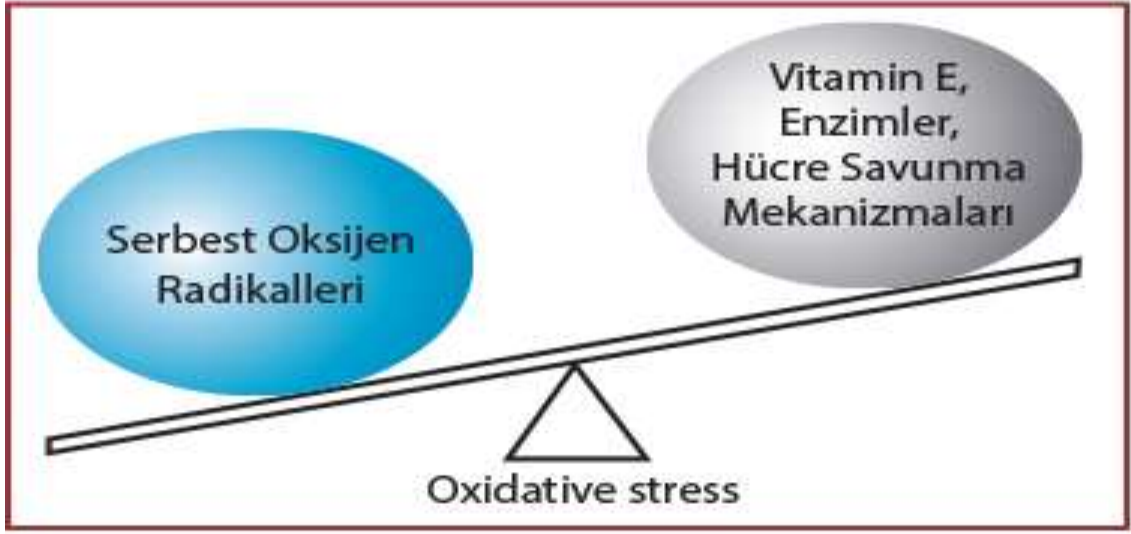
ENDOJEN ANTİOKSİDAN MADDELER	
ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR	NONENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR
Glutasyon redüktaz (GR), glutasyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutasyon-S-transferaz (GST).	Bilirubin, melatonin, glutasyon, albümin, ürik asit, transferin, lipoik asit, koenzim Q, selenyum, seruloplazmin, bilirubin, ferritin, transferin ve laktoferin.
EKSOJEN ANTİOKSİDAN MADDELER	
ANTİOKSİDAN VİTAMİNLER	İLAÇ OLARAK KULLANILAN ANTİOKSİDALAR
E vitamini, β-karoten, askorbik asit ve flavonoidler.	Ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH oksidaz inhibitörleri, endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar, demir şelatörleri.....vb.

2.4. Oksidatif Stres

Vücutta doğal metabolik yollar ile oluşan serbest radikaller antioksidan sistemlerle ortadan kaldırılır. Serbest radikaller ve antioksidanlar arasında bir denge bulunmaktadır. Bu dengenin oksidanlar tarafına bozulması oksidatif stres olarak adlandırılır. Bu olgu endojen ve eksojen kaynaklara bağlı olarak serbest radikallerin oluşumunun artışından veya antioksidan aktivitesinin eksikliğinden ileri gelebilir. Oksidatif stres birçok patojenik mekanizmalarda önemli rol oynamaktadır (Lee ve Blair, 2001).

Oksidatif stres çeşitli hastalıklarda hücrel ve moleküler doku hasarının bir parçasıdır. Oksidatif stresin belirlenmesi, tamamlayıcı bir bileşen olarak son zamanlarda klinik pratikte önem kazanmıştır. Hayvanlarda sepsis, mastitis, enterit, solunum ve eklem hastalıkları, endoparaziter hastalıklar, taşıma, sarkoptik uyuz, gebelik gibi çeşitli durumlarda oksidatif stresin ortaya çıktığı kanıtlanmıştır (Aktas ve ark., 2017).

Oksidatif Stres



Şekil 3. Oksidan miktarı ile antioksidan sistemler arasındaki denge (Anonim, 2022).

2.5. Total Antioksidan Kapasite (TAK)

Normal koşullarda biyolojik organizma, endojen ve eksojen kaynaklı serbest radikallerin meydana getirdiği oksidatif stresi engelleyen antioksidan savunma sistemine sahiptir. TAK'ın oluşmasında en büyük payı plazmada bulunan antioksidan molekülleri oluşturmaktadır. Çünkü plazma antioksidanların tüm vücuda dağıtılmasını sağlar. Plazmada antioksidanlar etkileşim halindedir. Bu nedenle antioksidanların yalnız başlarına oluşturdukları tesirin toplamından daha büyük bir antioksidan etki meydana gelmektedir. Bu sinerjik etkiye örnek olarak; serbest radikaller ile reaksiyona giren α - tokoferolden (α -TC) meydana gelen α -tokoferoksil radikalının (α -TC.) askorbik asit ve glutatyon tarafından α -TC'ye geri dönüştürülmesi verilebilir. TAK ölçümü, antioksidanların sıradan toplamından daha entegre bir parametre olarak plazma ve vücut sıvılarında bulunan antioksidanların hepsinin var olan kümülatif kapasitesini ifade eder (Ghisellia ve ark., 2000; Erel, 2004).

2.6. Total Oksidan Kapasite (TOK)

Oksidatif stres; canlılarda mevcut olan oksidan-antioksidan dengenin oksidanlar tarafına kayması sonucu oluşan patolojik bir süreçtir (Demircan, 2013). Bu durum; serbest radikallerin üretiminin artması veya antioksidan mekanizmanın noksanlığına

bağlı olarak gelişir. Bu oksidan maddeler toksik özellikleri nedeniyle protein, lipid ve DNA gibi moleküllere zarar vermektedir (Bowen ve ark., 2001). Oksidatif stresin toplam değeri; total oksidatif stres (TOS) veya total oksidan kapasite (TOK) olarak belirtilir (Demircan, 2013). Antioksidanlarda olduğu gibi oksidan moleküller de birbirleriyle etkileşime girdiği için seviyelerini tek tek ölçmek çok doğru bir sonuç vermeyebilir. Ayrıca oksidan moleküllerin konsantrasyonlarının tek tek ölçülmesi maliyetli ve vakit alması nedeniyle TOK ölçümü tercih edilmektedir (Gültekin ve ark., 2017).

2.7. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Oksidatif stres indeksi (OSİ); TOK seviyesinin TAK seviyesine bölünüp elde edilen sonucun yüz ile çarpılması ile elde edilen oransal bir indekstir. OSİ oksidatif stres derecesinin kapsamlı bir şekilde değerlendirmesini sağlar. Yüksek olması oksidatif stresin artışına işaret eder (Pugliese ve ark., 2022).

2.8. Tiyol - Disülfid Denge (TDD)

Tiyoller sülfhidril (-SH) grubu bulunduran fonksiyonel organik bileşiklerdir. Plazma tiyollerinin küçük bir bölümünü düşük molekül ağırlıklı moleküller olan sistein, sisteinil glisin, glutatyon, homosistein ve γ -glutamil sistein oluştururken daha büyük bir bölümünü albumin ve diğer proteinlerin tiyolleri oluşturur (Turell ve ark., 2013). Tiyoller antioksidan ve prooksidan özelliklere sahiptirler. Tiyollerin antioksidan veya prooksidan olarak davranıp davranmayacağı oksidatif stres, fizyolojik şartlar ve yapılarında sülfür bulunduran aminoasitlerin ortamdaki düzeyleri tarafından belirlenir. Organizmada oluşan ROT gibi oksidatif ürünler fazla elektronlarını tiyol (RSH) içeren bileşiklere aktararak indirgenirken tiyol grupları okside olur. Tiyol gruplarının okside olması ile disülfid (RSSR) bağları oluşur. Bu tepkime reversibildir ve oluşan disülfid bağları tekrar tiyol gruplarına indirgenebilir. Böylece dinamik tiyol-disülfid dengesi (TDD) sağlanmış olur. Bu denge detoksifikasyon, antioksidan savunma, enzimatik aktivitenin düzenlenmesi ve hücrel sinyal iletiminde kritik rollere sahiptir. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda TDD'nin bozulmasının diabetes mellitus, kanser, kardiovasküler hastalıklar ve çeşitli nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok rahatsızlıklar ile ilişkisi tespit edilmiştir (Erel, 2004).

Tiyol-disülfid dengesinde eskiden redükte tiyol seviyesi ölçülüyordu. Erel ve Neşelioğlu tarafından her iki değişken düzeyini ayrı ayrı ve toplam olarak ölçebilen yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Tiyol disülfid denge ölçümünde; nativ tiyol (-SH), dinamik disülfid (-S-S-), total tiyol [(-SH)+(-S-S-)], disülfid [-S-S-] / nativ tiyol (-SH) %, disülfid (-S-S-) / total tiyol [(-SH)+(-S-S-)] ve nativ tiyol (-SH) / total tiyol [(-SH)+(-S-S-)] değişkenleri hesaplanmaktadır. Total tiyol ifadesi indirgenmiş ve oksitlenmiş tiyolları kapsarken, doğal (nativ) tiyol ifadesi ise yalnız indirgenmiş tiyolları kapsar (Erel ve Neşelioğlu, 2014).

2.9. Albümin (ALB)

Kan plazmasında en fazla bulunan protein olan albümin 585 amino asit kalıntısı içeren primer zincir, 17 disülfid bağı ve 1 serbest sistein amino asitinden oluşur. Karaciğerde sentez edilir. Albüminin yarı ömrü yaklaşık 19-20 gündür ve molekül ağırlığı 6,5 kDa dır (Kancı Bozoğlu, 2012). Albüminin en önemli görevi onkotik basıncı sağlamaktır. Bunun yanı sıra plazmada bulunan organik veya inorganik yapıdaki birçok maddeyi ilgili yerlere taşıma, endojen aminoasitlerin sentezinde kaynak oluşturma ve oksidatif stres durumlarında negatif akut faz reaktan olma gibi farklı fonksiyonları bulunmaktadır (Kırmızıgül ve ark., 2020).

2.10. İskemi Modifiye Albümin (İMA)

Albüminin N-terminal ucunda aspartat-alanin-histidin-lizin amino asit kalıntısı yer almakta ve bu bölge (Co^{+2}), nikel (Ni^{+2}) ve bakır (Cu^{+2}) gibi geçiş metallerine karşı yüksek affiniteli bir bağlanma bölgesi niteliği göstermektedir. Bununla birlikte bu bölgenin diğer metal iyonlarına kıyasla kobalt (Co^{+2}) için daha güçlü bağlanma kapasitesi gösterdiği tespit edilmiştir (Bar-Or ve ark., 2001).

Serbest radikal harabiyeti, enerjiye bağlı membran yıkımı, serbest demir (Fe) ve bakıra (Cu) maruz kalma, asidoz ve hipoksi gibi durumlarda albüminin N-terminal ucundaki amino asitlerin bir veya daha fazlasının silinmesi veya N-asetilasyonu yoluyla N-terminal uçta yapısal modifikasyonların oluşmasına neden olur (Bar-Or ve ark., 2000; Lippi ve ark., 2006). Albümindeki bu yapısal modifikasyonlar, albüminin Co^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} gibi geçiş metallerini bağlama kapasitesinde azalmaya neden olur. Bu yeni oluşan

albümin molekülü, iskemi ile modifiye olmuş albümin (iskemi modifiye albümin - İMA) olarak isimlendirilir. İMA oksidatif strese bağlı indüklenen protein modifikasyonuna işaret eder (Bar-Or ve ark., 2001). Bu metabolik değişken albümin kobalt bağlanma testi ile ölçülebilir hale getirilmiştir (Bar-Or ve ark., 1999; Bar-Or ve ark., 2000). İMA sadece miyokardiyal iskemi değil farklı organları etkileyen diğer iskemi modellerinde de artan oksidatif stres nedeniyle meydana gelir. Serum İMA seviyesi pulmoner emboli, böbrek rahatsızlıkları, diabetes mellitus (DM), karaciğer hastalıkları ve bazı kanserlerde artar (Can ve Yosunkaya, 2017).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hayvan materyali

Bu çalışma Van Merkez ve civar ilçelerden, Van Büyükşehir Belediyesi'ne bağlı Hayvan Bakım ve Rehabilitasyon Merkezine ovariohisterektomi ve kastrasyon için getirilen farklı yaş ve cinsiyette 91 adet sokak köpeği üzerinde yürütüldü. Hayvanlar kısırlaştırma operasyonundan bir gün önce aç bırakıldı ve son 12 saat sadece su içti. Bu köpeklerden yüksek ateş, ikterus, zayıflık, solunum ve nabız sayısında artış gibi klinik semptomlardan en az ikisine sahip köpeklerden alınan kan örnekleri Babesia-ELISA dog kiti (Afosa, Germany) ile test edildi. Testi pozitif çıkan köpekler babesiosis grubuna (3 dişi, 4 erkek) dahil edildi. Karşılaştırma için klinik muayene sonucu sağlıklı olduğu ve kan örnekleri Babesia-ELISA dog kiti (Afosa, Germany) ile testi negatif çıkan köpekler kontrol grubuna (3 dişi, 4 erkek) dahil edildi.

Çalışma öncesi Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan 28.10.2021 tarih ve 2021/10-04 sayı ile onay alındı.

3.1.2. Analizlerde kullanılan cihaz ve malzemeler

Hassas terazi (GeeAvery)
Soğutmalı santrifüj (Universal 320R)
Derin dondurucu (Uğur)
Su banyosu (Nüve, BM 402)
Spektrofotometre (Boeco, Almanya)
ELISA (BiotekELx800)
Vakkumlu jelli tüp
Değişik hacimlerde otomatik pipet
ELISA mikropate okuyucu (Zenyth, 200 rt)
Oto analizör (Roche, Almanya)
Hassas terazi (Bosch S 2000)

3.1.3. Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler

Babesia-ELISA dog kiti (Afosa, Germany)
Perklorik asit (HClO_4 , Sigma Aldrich)
Total antioksidan status (TAS) kit (Rel Assay Diagnostics)
Total oksidan status (TOS) kit (Rel Assay Diagnostics)
Sodyum borhidrat (H_4BNa , Sigma Aldrich)
Kobalt (II) klorür (CoCl_2 , Sigma Aldrich)
DL-Dithiothreitol ($\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{SH}$, Sigma Aldrich)
Formaldehit (CH_2O , Sigma Aldrich)
Etilendiamin tetraasetik asit ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$, Sigma Aldrich)
5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoik asit) ($\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$, Sigma Aldrich)
Butil asetat ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_2$, Sigma Aldrich)

3.2. Yöntem

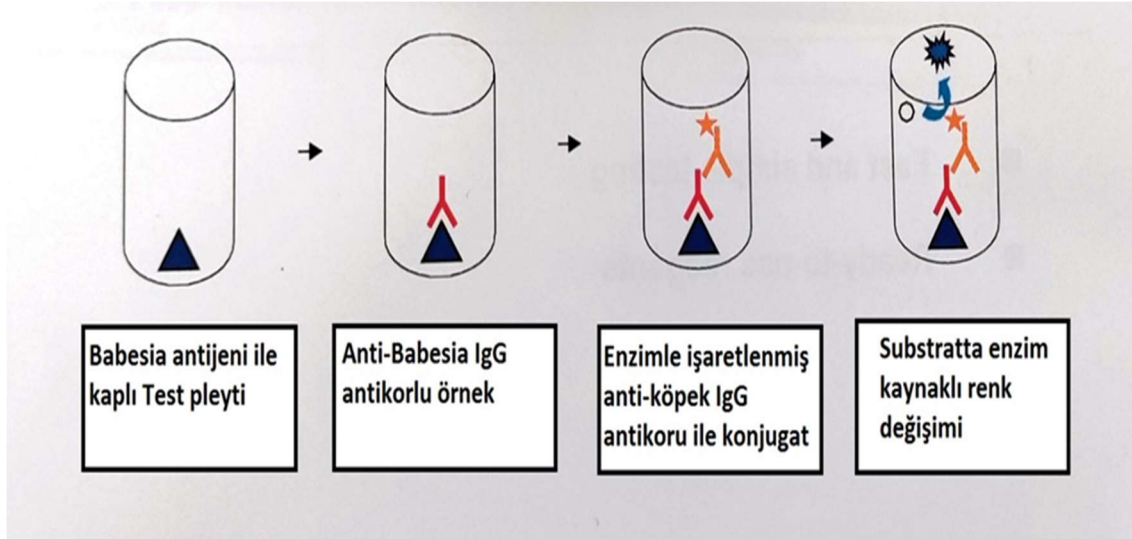
3.2.1. Kan örneklerinin alınması

Çalışmaya dahil edilen köpeklerin vena cephalica antebrachii'lerinden yöntemine uygun olarak 10 ml'lik jelli vakumlu biyokimya tüplerine kan örnekleri alındı. Kanlar 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve serumları ayrıldı. Elde edilen serumlarda parazitolojik olarak babesiosis teşhisi ve biyokimyasal olarak TAK, TOK, TT, NT, İMA ve ALB analizi yapıldı.

3.2.2. Parazitolojik analiz

Elde edilen serumlar *Babesia canis* IgG antikorları yönünden Babesia-ELISA dog kiti (Afosa, Germany) ile tarandı. Teste başlamadan önce; serum örnekleri, antijen kaplı stripler ve tüm kit reaktifleri oda ısısına getirildi. Test edilecek örnekler serum sulandırma tamponu ile 1/100 oranında sulandırıldı. Uygun kuyucuklara her bir kontrol serumundan (pozitif kontrol ve negatif kontrol) 100 µl koyuldu. Boş değer için uygun kuyuya 100 µl örnek seyreltme tamponu konuldu. Uygun kuyucuklara önceden seyreltilmiş numuneden 100 µl konuldu. Oda ısısında 60 dk inkube edildikten sonra plate içeriği dökülerek 4 kez 1x yıkama solüsyonu ile yıkandı. Konjugat solüsyonu her göze 100 µl konularak oda ısısında 60 dk inkube edildikten sonra plate içeriği dökülerek 4 kez 1x yıkama solüsyonu

ile yıkandı. Substrat solüsyonu her göze 1000 µl ilave edilerek oda ısısında 15 dk inkübe edildi. Plate boşaltılmadan her bir göze 100 µl stop solüsyon eklenerek optik dansite (OD) 450 nm de ELISA okuyucusunda okutuldu.



Şekil 4. Çalışmada kullanılan Babesia ELISA dog kitinin şematik tanımı.

Pozitif kontrollerin (PK) ve negatif kontrollerin (NK), (ODPK, ODNK) optik yoğunluğunun ortalaması hesaplandı.

Negatif kontrollerin optik yoğunluğunun ortalaması, pozitif kontrollerin optik yoğunluğunun ortalamasından ve numunelerin optik yoğunluğundan (OD sample) çıkarıldı.

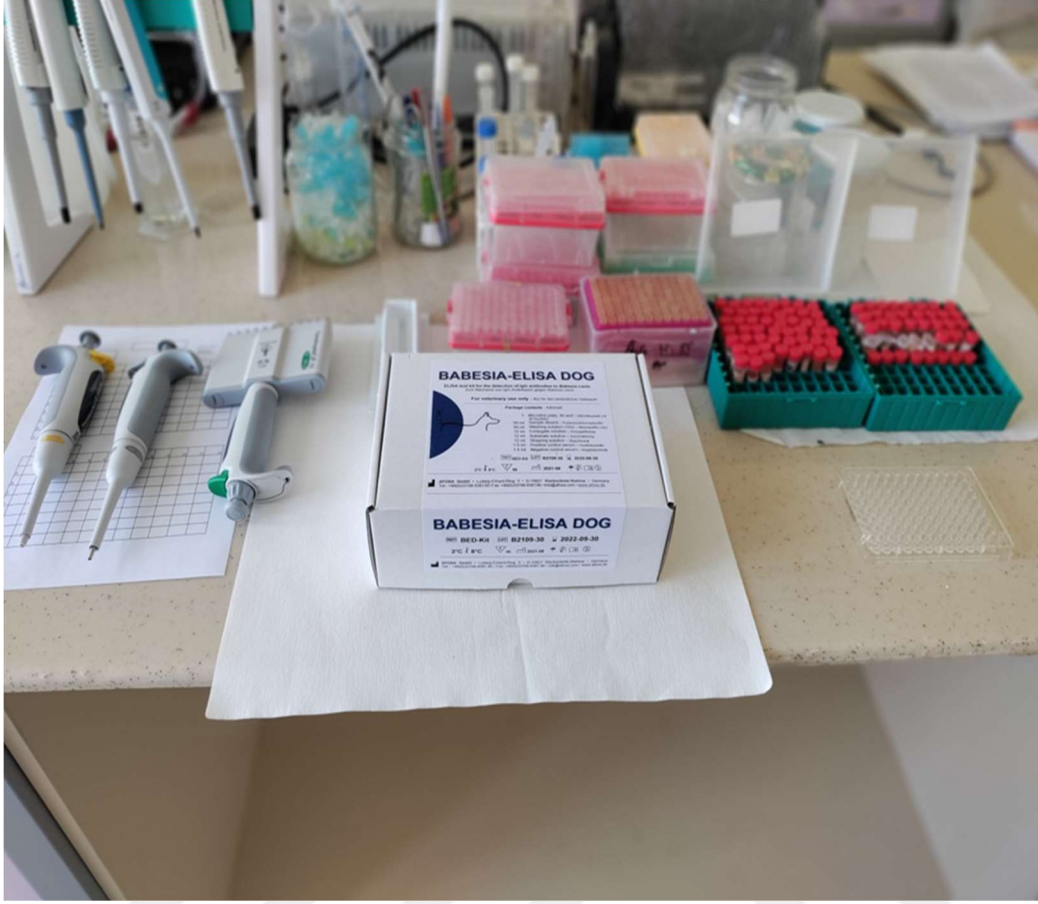
ODPK, düzeltme = ODPK – ODNK; OD sample, düzeltme = OD sample – ODNK; Test sonucu (TR) aşağıdaki formüle göre hesaplandı. $TR = (OD \text{ örnek, doğru} \times 100) / (ODPK, \text{doğru})$.

Test sonuçlarının değerlendirilmesi

$TR < 14 = \text{negatif}$

$TR 14 - 19 = \text{sonuçsuz}$

$TR > 19 = \text{pozitif kabul edildi}$



Şekil 5. Çalışmada kullanılan Babesia ELISA dog kiti.

3.2.3. Biyokimyasal analizler

Total antioksidan kapasite (TAK) ölçümü:

Grupların TAK seviye ölçümü Erel tarafından geliştirilen ticari kit (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak ELISA (BiotekELx 800) cihazında gerçekleştirildi (Erel, 2004).

Prensip: Numunedeki antioksidanlar koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikalini renksiz indirgenmiş ABTS formuna indirger. 660 nm'de absorbans değişikliği numunenin toplam antioksidan seviyesi ile ilgilidir. Kalibratör olarak geleneksel olarak bir E vitamini analogu olan Trolox Eşdeğeri olarak adlandırılan stabil bir antioksidan standart çözelti kullanılır.

Tablo 3. Total antioksidan kapasite (TAK) seviye ölçüm basamakları.

	Numune	Standart	Kör
Reaktif 1	300 µl	300 µl	300 µl
Numune	18 µl	-	-
Standart	-	18 µl	-
H ₂ O	-	-	18 µl

660 nm’ de başlangıç absorbanslar okunup (ilk okuma) değerler kaydedildi.

Reaktif 2	45 µl	45 µl	45 µl
-----------	-------	-------	-------

Karışım 37°C’de 5 dk inkübe edildikten sonra 660 nm’ de absorbanslar okunup (ikinci okuma) değerler kaydedildi.

Absorbans değerleri aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı.

$$\Delta\text{Abs H}_2\text{O} = \text{H}_2\text{O ikinci okuma} - \text{H}_2\text{O ilk okuma}$$

$$\Delta\text{Abs Standart} = \text{Standart ikinci okuma} - \text{Standart ilk okuma}$$

$$\Delta\text{Abs Örnek} = \text{Örnek ikinci okuma} - \text{Örnek ilk okuma}$$

TAK (mmolTroloxEq/l) = ($\Delta\text{Abs H}_2\text{O} - \Delta\text{Abs Örnek}$) / ($\Delta\text{Abs H}_2\text{O} - \Delta\text{Abs Standard}$) formülü kullanılarak TAK değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar mmolTroloxEq/l olarak ifade edildi.

Total oksidan kapasite (TOK) ölçümü:

Grupların TOK seviye ölçümü Erel tarafından geliştirilen ticari kit (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak ELISA (BiotekELx 800) cihazında gerçekleştirildi (Erel, 2005).

Prensip: Numunede bulunan oksidanlar demirli iyon-şelatör kompleksini demir iyonuna oksitler. Oksidasyon reaksiyonu reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan güçlendirici moleküller tarafından uzatılır. Ferrik iyon asidik bir ortamda kromojen ile renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, numunede

bulunan oksidan moleküllerin toplam miktarı ile ilgilidir. Ölçümde kalibratör olarak hidrojen peroksit (H₂O₂) kullanılır.

Tablo 4. Total oksidan kapasite (TOK) seviye ölçüm basamakları.

	Numune	Standart	Kör
Reaktif 1	300 µl	300 µl	300 µl
Numune	18 µl	-	-
Standart	-	18 µl	-
H ₂ O	-	-	18 µl

530 nm’ de başlangıç absorbanslar okunup (ilk okuma) değerler kaydedildi

Reaktif 2	15 µl	15 µl	15 µl
-----------	-------	-------	-------

Karışım 37°C’de 5 dk inkübe edildikten sonra 660 nm’ de absorbanslar okunup (ikinci okuma) değerler kaydedildi.

Absorbans değerleri aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı.

$$\Delta\text{Abs Örne} = \text{Örnek ikinci okuma} - \text{Örnek ilk okuma}$$

$$\Delta\text{Abs Standart} = \text{Standart ikinci okuma} - \text{Standart ilk okuma}$$

$\text{TOK } (\mu\text{molH}_2\text{O}_2\text{Eq/l}) = (\Delta\text{Abs Örne} / \Delta\text{Abs Standart}) \times 10^*$ formülü kullanılarak TAK değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar $\mu\text{molH}_2\text{O}_2\text{Eq/l}$ olarak ifade edildi. (*standartın konsantrasyonu)

Oksidatif stres indeksi (OSİ) hesaplanması:

Grupların OSİ seviyesi, TOK seviyesinin TAK seviyesine bölünüp elde edilen sonucun yüz ile çarpılmasıyla hesaplandı. TAK değerleri $\mu\text{mol/L}$ ’ye çevrildi. Elde edilen sonuçlar AU olarak ifade edildi (Erel, 2005).

$$\text{OSİ (AU)} = \text{TOK/TAK} \times 100$$

Total tiyol (TT) ve nativ tiyol (NT) ölçümü:

TT ve NT seviye ölçümleri Erel ve Neşelioğlu (2014), tarafından tarif edilen modifiye Ellman yöntemi kullanılarak ELISA (BiotekELx 800) cihazında gerçekleştirildi.

Prensip: İndirgenabilir disülfid bağları sodyum borohidrat ile serbest fonksiyonel tiyol grupları oluşturmak üzere indirgenir. Kullanılmayan indirgeyici sodyum borohidrat formaldehidle bağlanarak uzaklaştırılır. İndirgenmiş ve serbest olanları içeren tüm tiyol grupları DTNB (5,5-dithiobis-(2 nitrobenzoik asit) ile reaksiyonu sonrasında tespit edilir.

Kullanılan reaktifler:

R1: 378 mg sodyum borhidrat (NaBH_4)'ın 1000 mL su-metanol solüsyonu içinde (1/1 hacim oranı ile) son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde çalışmanın yapılacağı gün taze olarak hazırlanarak kullanıldı. Bu indirgeyici reaktif total tiyol (TT) miktarını belirlemek için kullanıldı.

R1': 585 mg sodyum klorür (NaCl)'ın 1000 mL su- metanol solüsyonu içinde (1/1 hacim oranı ile) son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde çalışmanın yapılacağı gün taze olarak hazırlandı. Elde edilen reaktif $+4^\circ\text{C}$ de 6 ay süre ile saklanabilir. Bu reaktif nativ tiyol (NT) miktarını belirlemek için kullanıldı.

R2: Son konsantrasyonu 6,715 mM olan 0,5 mL formaldehit ve son konsantrasyonu 10 mM olan 3,8 g etilendiamin tetra asetik asitin (EDTA) 1000 mL Tris tampon içerisinde, 100 mM ve pH 8,2 de çözülerek taze olarak hazırlandı. Elde edilen reaktif $+4^\circ\text{C}$ de 6 ay süre ile saklanır.

R3: 3,963 g 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) 1000 mL metanol içerisinde son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde çalışma gününde taze olarak hazırlandı.

Tablo 5. Total tiyol (TT) ve nativ tiyol (NT) seviye ölçüm basamakları.

	Total tiyol	Nativ tiyol
R1	10 µl	-
R1'	-	10 µl
Serum	10 µl	10 µl
R2	110 µl	110 µl
R3	10 µl	10 µl

415 nm'de başlangıç absorbanslar okunup (ilk okuma) değerler kaydedildi. Reaksiyonun plato yaptığı 10. dk da 415 nm'de ikinci absorbanslar okunup (ikinci okuma) değerler kaydedildi. İkinci okuma absorbans – ilk okuma absorbans farkı elde edilerek ölçüm tamamlandı.

TT ve NT seviyelerinin belirlenmesinde 5-tiyo-2-nitrobenzoik asitin (TNB) molar ekstinksiyon katsayısı olan $14,100 \text{ mol/L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanıldı. Elde edilen sonuçlar $\mu\text{mol/L}$ olarak ifade edildi.

Disülfid (Ds) konsantrasyonu ve Ds/NT, Ds/TT ve NT/TT oranlarını hesaplamak için aşağıdaki formüller kullanıldı (Değirmençay ve ark., 2021).

$$\text{Ds } (\mu\text{mol/L}) = (\text{TT} - \text{NT}) / 2$$

$$\text{Ds/ NT dengesi (\%)} = (\text{Ds} / \text{NT}) \times 100$$

$$\text{Ds/ TT dengesi (\%)} = (\text{Ds} / \text{TT}) \times 100$$

$$\text{NT/ TT dengesi (\%)} = (\text{NT} / \text{TT}) \times 100$$

İskemi modifiye albümin (İMA) ölçümü:

Grupların İMA seviye ölçümü Bar-Or ve ark. (2000), tarafından geliştirilen albümin kobalt bağlama yöntemi kullanılarak spektrofotometre (Boeco, Almanya) cihazında gerçekleştirildi.

Prensip: Örneğe eklenen ve albümine bağlanmayan kobaltın ditiyotritol (DTT) ile oluşturduğu renkli kompleksin ölçümüne dayanmaktadır.

Kullanılan reaktifler:

1 g/L kobalt klorür ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

1,5 mg/ml ditiyotritol (DTT)

%0,9 sodyum klorür (NaCl)

Tablo 6. İskemi modifiye albümin (İMA) seviye ölçüm basamakları.

	Kör	Numune
Serum	200 μl	200 μl
Kobalt klorür	50 μl	50 μl

Karışım vortekslenip albümin-kobalt bağlanmasının oluşması için 10 dk boyunca karanlıkta inkübe edildi.

DTT	-	50 μl
Distile su	50 μl	-

Tüpler vorteksle karıştırılarak 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

%0,9 NaCl	1 mL	1 mL
--------------------	------	------

470 nm 'de hem kör hem de numune tüplerinin absorbansları okunup değerler kaydedildi.

İMA (ABSU)= (ΔAbs Kör- ΔAbs Numune) formülü kullanılarak İMA değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar ABSU olarak ifade edildi.

Albümin ölçümü:

Grupların albümin seviye ölçümü ticari kit kullanılarak (Roche, Almanya), modüler oto analizör cihazında (Roche, Almanya) gerçekleştirildi. Sonuçlar g/L olarak ifade edildi.

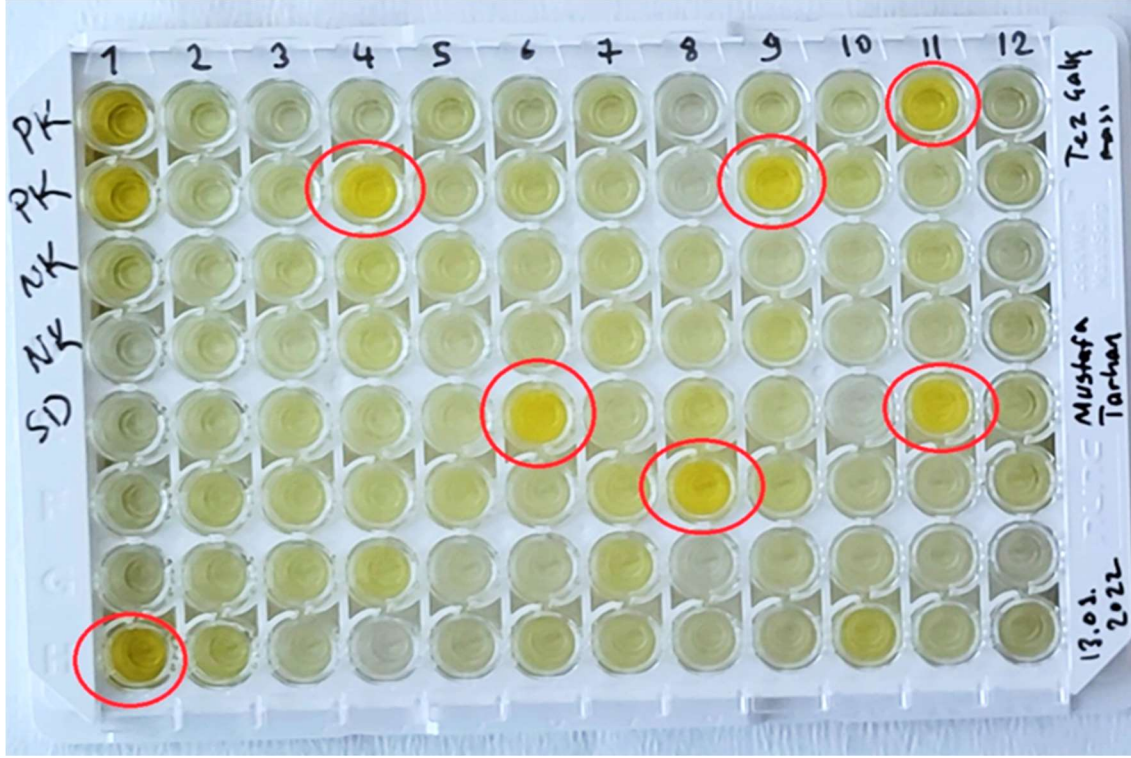
3.3. İstatistik Analiz

Yapılan analizlerden elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde SPSS (20) istatistik paket programı kullanıldı. Her parametre için veri dağılımının normalliği Shapiro-Wilk testi kullanılarak değerlendirildi. Gruplar arasındaki farkı belirlemek için bağımsız örneklem t testi kullanıldı. Sayısal değişkenler Pearson korelasyon testi temelinde karşılaştırıldı. Duyarlılık, seçicilik ve kesim değerlerini belirlemek için Receiver Operating Characteristic (ROC) analizi yapıldı.



4. BULGULAR

Toplanan 91 köpeğe ait serum örnekleri Babesia türlerinin antikorlarının varlığı yönünde serolojik olarak incelendiğinde %7,69' unun (7 örnek) babesiosis yönünden seropozitif olduğu tespit edildi. ELISA inhibisyon değeri yüksek olan köpek kanları biyokimyasal analizler için kullanıldı.



Şekil 6. Babesia türleri yönünden seropozitif ve seronegatif kan serumlarının ELISA pleytindeki görünümü. (İşaretli olanlar pozitifdir)

Kontrol ve babesiosisli grupların TAK, TOK, OSİ, TDD parametreleri, İMA ve ALB seviyelerinin Ort $\pm$ SS degerleri ve aralarındaki farkın istatistiki karşılaştırma sonuçları Tablo 7’de verildi. Buna göre;

TAK ve ALB seviyeleri açısından, babesiosisli grubun ortalamasının, kontrol grubunun ortalamasına göre anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi ($p<0,05$).

TOK ve OSİ seviyeleri açısından, babesiosisli grubun ortalamasının kontrol grubunun ortalamasına göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi ($p<0,05$).

NT, Ds ve İMA seviyeleri ile NT/TT, Ds/ NT ve Ds/ TT oranları açısından, babesiosisli grubun ortalaması ile kontrol grubunun ortalaması arasında istatistiki olarak fark olmadığı tespit edildi ($p>0,05$).

Tablo 7. Kontrol ve babesiosisli grupların TAK, TOK, OSİ, TDD parametreleri, İMA ve ALB seviyelerinin karşılaştırılması.

Parametreler	Kontrol grubu (n=7) (Ort $\pm$ SS)	Babesiosisli grup (n=7) (Ort $\pm$ SS)	p
TAK(mmol TroloxEqv./L)	0,84 $\pm$ 0,15	0,55 $\pm$ 0,13	0,003
TOK (μ mol H ₂ O ₂ Eqv./ L)	14,20 $\pm$ 2,47	16,75 $\pm$ 1,59	0,041
OSİ (AU)	1,73 $\pm$ 0,42	3,02 $\pm$ 0,59	0,001
NT (μ mol/L)	1,87 $\pm$ 0,71	1,24 $\pm$ 0,49	0,082
TT (μ mol/L)	3,73 $\pm$ 0,85	3,10 $\pm$ 0,36	0,100
NT/TT (%)	53,57 $\pm$ 27,76	38,96 $\pm$ 10,85	0,219
Ds (μ mol/L)	0,92 $\pm$ 0,65	1,00 $\pm$ 0,13	0,770
Ds/ NT (%)	65,58 $\pm$ 48,44	88,93 $\pm$ 26,55	0,285
Ds/TT (%)	23,02 $\pm$ 13,89	32,39 $\pm$ 3,64	0,110
İMA (ABSU)	59 $\pm$ 0,220	60 $\pm$ 0,20	0,940
ALB (gr/L)	30,14 $\pm$ 3,23	23,71 $\pm$ 1,60	0,001

TAK: total antioksidan kapasite, TOK: total oksidan kapasite, OSİ: oksidatif stres indeksi, NT: nativ tiyol, TT: total tiyol, Ds: disülfid, İMA: iskemi modifiye albümin, ALB: albümin, TDD: tiyol-disülfid denge.

Babesiosisli grubun TAK, TOK, OSİ, TDD parametreleri, İMA ve ALB seviyeleri arasındaki korelasyon katsayıları (r) Tablo 8’de verildi. Buna göre;

TAK seviyesi ile OSİ seviyesi arasında istatistiki olarak anlamlı negatif korelasyon olduğu saptandı ($p<0,05$).

NT seviyesi ile TT seviyesi ve NT/TT oranı arasında istatistiki olarak anlamlı pozitif korelasyon olduğu saptandı ($p<0,001$).

NT seviyesi ile Ds/NT oranı arasında istatistiki olarak anlamlı negatif korelasyon olduğu saptandı ($p<0,001$).

TT seviyesi ile NT/TT oranı arasında istatistiki olarak anlamlı pozitif korelasyon olduğu saptandı ($p<0,001$).

TT seviyesi ile Ds/NT oranı arasında istatistiki olarak anlamlı negatif korelasyon olduğu saptandı ($p<0,001$).

NT/TT seviyesi ile Ds/NT oranı arasında istatistiki olarak anlamlı negatif korelasyon olduğu saptandı ($p<0,001$).



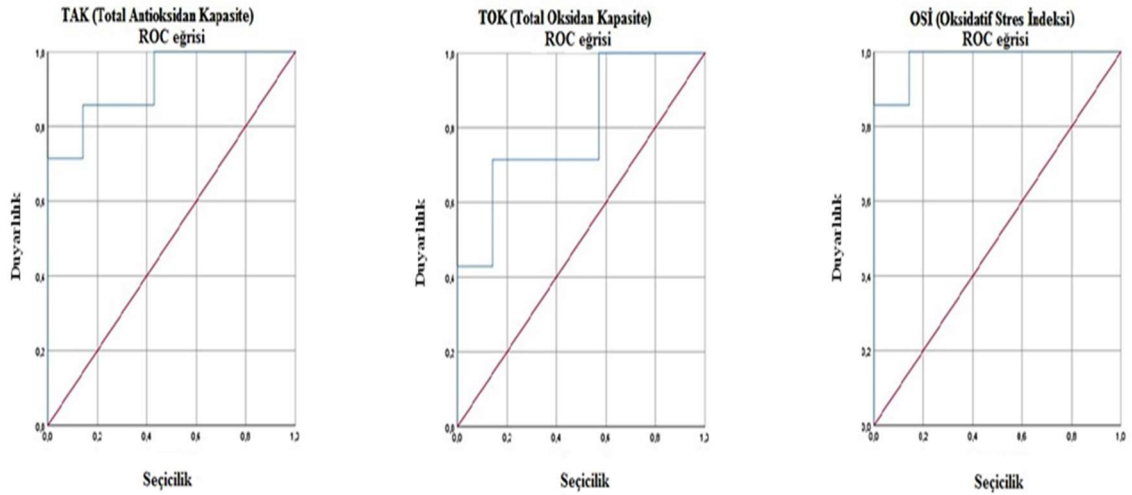
Tablo 8. Babesiosisli grubun TAK, TOK, OSİ, TDD parametreleri, İMA ve ALB seviyeleri arasındaki korelasyon analiz sonuçları.

		TAK	TOK	OSİ	NT	TT	NT/TT	Ds	Ds/NT	Ds/TT	İMA	ALB
TAK	r	1	-0,517	-0,806*	0,083	0,289	0,29	-0,382	-0,168	-0,600	0,231	0.363
	p		0,234	0,029	0,859	0,606	0,951	0,398	0,719	0,155	0,618	0.423
TOK			1	-0,166	-0,355	-0,101	-0,434	0,058	0,390	0,050	0,225	-0.246
				0,723	0,435	0,829	0,331	0,901	0,387	0,916	0,628	0.595
OSİ				1	-0,126	-0,227	-0,096	0,408	0,250	0,606	0,407	0.458
					0,788	0,625	0,838	0,364	0,589	0,149	0,364	0.302
NT					1	0,953**	0,995**	-0,501	-0,919**	-0,416	-0,165	0.498
						0,001	0,0001	0,252	0,003	0,354	0,724	0.256
TT						1	0,924**	-0,500	-0,884**	-0,462	0,035	0.555
							0,003	0,253	0,008	0,297	0,941	0.196
NT/TT							1	-470	-0,930**	-0,421	-0,163	0.445
								0,287	0,002	0,347	0,726	0.317
Ds								1	0,160	0,536	0,165	-0.477
									0,732	0,215	0,724	0.279
Ds/NT									1	0,704	0,038	0.281
										0,77	0,935	0.541
Ds/TT										1	0,173	0.017
											0,710	0.972
İMA											1	-0.612
												0.144
ALB												1

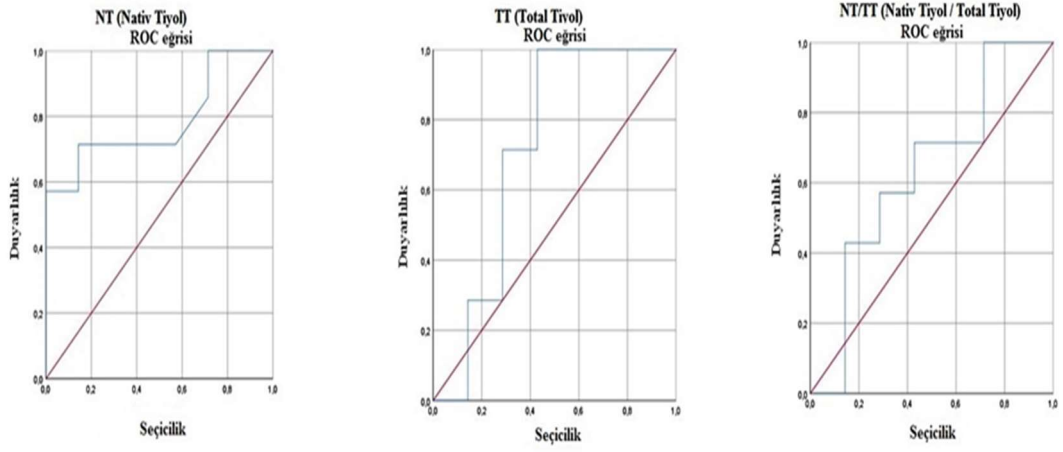
r- pearson korelasyon katsayı, *p<0,05,**p<0,001

Tablo 9. Kontrol ve babesiosisli grupların TAK, TOK, OSİ, TDD parametreleri, İMA ve ALB değişkenleri için ROC eğrisi analiz sonuçları.

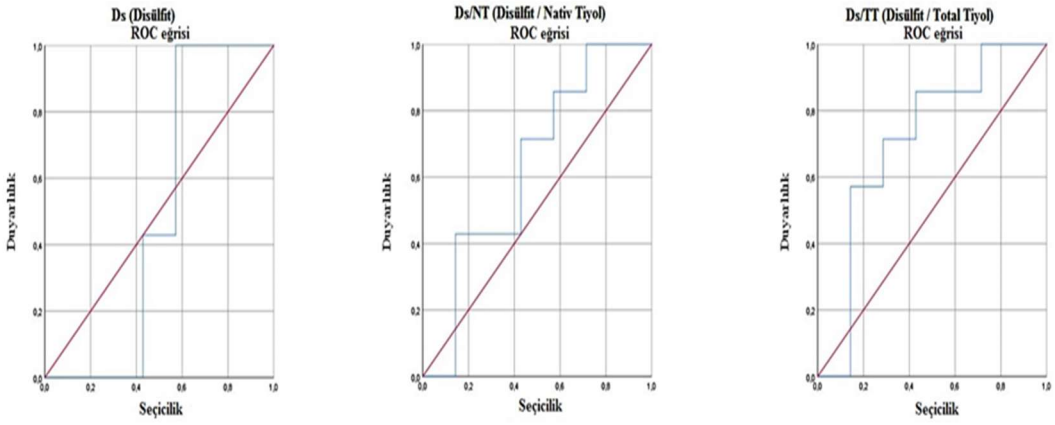
Parametre	AUC (Eğri altında kalan alan)	Kesim değeri	Duyarlılık (%)	Seçicilik (%)	p
TAK	0,918	0,833	100	57,1	0,009
TOK	0,796	15,86	71,4	71,4	0,049
OSİ	0,980	1,97	100	85,7	0,003
NT	0,786	1,55	71,4	57,1	0,074
TT	0,714	3,68	100	57,1	0,180
NT/TT	0,633	40,79	71,4	57,1	0,406
Ds	0,490	0,79	100	42,9	0,949
Ds/ NT	0,633	72,72	71,4	57,1	0,406
Ds/TT	0,714	32,37	71,4	71,4	0,180
İMA	0,469	0,53	57,1	42,9	0,848
ALB	1	27,50	100	100	0,002



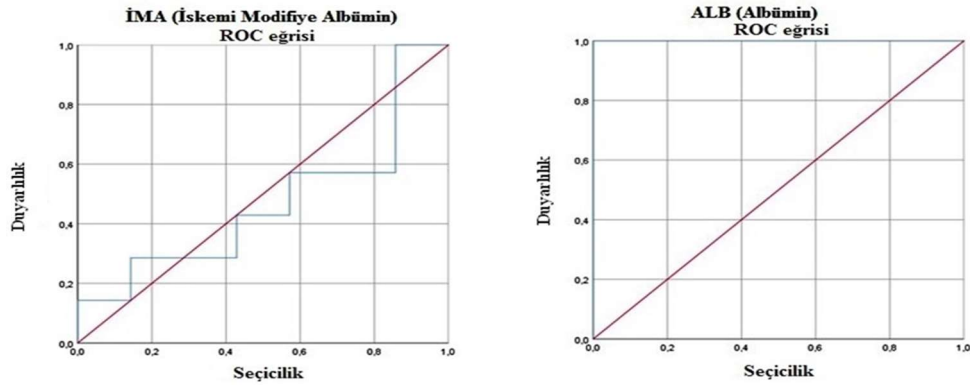
Şekil 7. TAK, TOK ve OSİ değişkenleri ROC eğrisi grafikleri.



Şekil 8. NT, TT ve NT/TT değişkenleri ROC eğrisi grafikleri.



Şekil 9. Ds, Ds/NT ve Ds/TT değişkenleri ROC eğrisi grafikleri.



Şekil 10. İMA ve ALB değişkenleri ROC eğrisi grafikleri.

Kontrol ve babesiosisli grupların TAK, TOK, OSİ, TDD parametreleri, İMA ve ALB seviyelerinin ROC eğrisi analiz sonuçları Tablo 9’da verildi. Buna göre;

TAK değişkeni için kesim değeri 0,833 alındığında duyarlılık %100 ve seçicilik %57,1 olarak bulundu (AUC: 0,918; $p<0.05$).

TOK değişkeni için kesim değeri 15,86 alındığında duyarlılık %71,4 ve seçicilik %71,4 olarak bulundu (AUC: 0,796; $p<0.05$).

OSİ değişkeni için kesim değeri 1,97 alındığında duyarlılık %100 ve seçicilik %85,7 olarak bulundu (AUC: 0,980; $p<0.05$).

ALB değişkeni için kesim değeri 27,50 alındığında duyarlılık %100 ve seçicilik %100 olarak bulundu (AUC: 1; $p<0.05$).

ROC analizi açısından NT, TT, NT/TT, Ds, Ds/ NT, Ds/TT ve İMA değişkenleri için eğri altında kalan alanın istatistiki olarak anlamlı olmadığı bulundu ($p>0,05$).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Babesiosis evcil ve yabani hayvanlar ile insanlarda görülen, eritrositler içerisine yerleşen *Babesia* türlerinin oluşturduğu hemoprotozoan bir enfeksiyon olarak bilinmektedir. Özellikle endemik bölgelerde babesiosis evcil hayvan yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara ve ölümlere yol açtığı bildirilmektedir (Uilenberg, 2006).

Köpeklerde babesiosis, dünyanın tropikal ve subtropikal bölgelerinde evcil köpekler ve yabani karnivorlarda görülen ve ölümle sonuçlanabilen bir hastalıktır. Köpeklere keneler tarafından taşınan bu hastalığa farklı *Babesia* türleri (*B. canis*, *B. gibsoni*, *B. vogeli*, *B. rossi* ve *B. vulpes*) neden olur. Eritrositlerin içerisine yerleşen etkenler armut şeklinde görülmektedir (Selçin ve Oğuz, 2022). Babesiosiste klinik bulgular perakut, akut, kronik ve subklinik olarak kendini gösterir (Gökçe ve ark., 2013). Bu bulgular konakçının ırk, yaş ve immun durumuna göre değişmekle birlikte, iştahsızlık, hemoglobinüri, ikterus, mukoz membranlarda solgunluk, farklı seviyelerde hemolitik anemi ve trombositopeni ile karakterizedir (Ulutaş ve ark., 2005; Crnogaj ve ark., 2017).

Hastalık sürecinde meydana gelen klinik bulguların büyük bir kısmını hem eritrositlerin hemolizi sonrasında meydana gelen hemolitik anemi hem de parazite karşı oluşan sistemik inflamatuvar yanıtlar meydana getirmektedir (Baneth, 2018). Babesiosiste eritrositlerin hemolizini takiben böbrek, karaciğer, akciğer vb. gibi bir veya daha fazla organda fonksiyon bozukluğunu içeren multiple organ disfonksiyonu (MOD) meydana gelebilmektedir (Solano-Gallego ve Baneth, 2011; Gökçe ve ark., 2013).

Babesiosiste aneminin patogenezi hala belirsizdir. Aneminin şiddeti her zaman paraziteminin derecesi ile orantılı değildir. Nitekim periferik kanda parazitler saptanmadan çok önce hematokritte belirgin bir düşüş meydana gelebilmektedir. Bu olay parazitlenmemiş eritrositlerin de parazit enfeksiyonu nedeniyle bilinmeyen bir mekanizmayla hasar görebileceğini düşündürmektedir (Crnogaj ve ark., 2010; 2017). Köpek babesiosisinde hemolizin mekanizması; mekanik, immun ilişkili sitotoksik parçalanma, parazitlerin ürettiği hemolitik toksinler ile açıklanmaktadır (Furlanello ve ark., 2005).

Reaktif oksijen/nitrojen türleri (ROT/RNT) yaşamsal faaliyetler sırasında sürekli olarak endojen olarak üretilir. Çeşitli patolojik süreçlere bağlı olarak aşırı üretilen bu serbest radikaller diğer moleküller ile reaksiyona girerek istenmeyen oksidasyon tepkimelerine neden olurlar. Sonuçta protein, lipit, karbonhidrat, nükleik asitlerde hasar, membran bütünlüğünün bozulması ve genetik bozuklukların gelişmesi gibi oksidatif hasarlar meydana gelir (Camkerten ve ark., 2009; Crnogaj ve ark., 2010).

Canlı organizmada serbest radikallerin oluşumunu engelleyen ve meydana getirdikleri hasarları önleyen antioksidan savunma sistemleri bulunur. Bu sistemler, scavenging (temizleme), quencher (baskılama), zincir koparma ve onarma mekanizmaları ile oksidanları etkisiz hale getirirler (Chaudhuri ve ark., 2008). Serbest radikallerin aşırı üretimi veya antioksidan sistemin zayıflığı sebebiyle hücrede oksidan/antioksidan dengenin oksidan lehine bozulması oksidatif strese neden olur. Oksidatif stresin birçok hastalık ve inflamatuvar sürecin patofizyolojisinde rol oynadığı bilinmektedir (Valko ve ark., 2007).

Poliansature yağ asidi (PUFA) yönünden zengin olma, yüksek konsantrasyonlarda oksijene sürekli maruz kalma ve güçlü bir metal katalizör olan demirin varlığı eritrositleri peroksidatif hasara karşı duyarlı hale getirir (Clemens ve Waller, 1987). ROT'un eritrosit membranında neden olduğu lipid peroksidasyonu (LPO) düzensizliğe ve nihayetinde hücre zarının hasarına neden olarak nekrotik ölüme yol açar. LPO hücrelerde ve dokularda oksidatif stresin bir göstergesi olarak kullanılır (Oliveira ve Cechini, 2002).

Parazitlerin neden olduğu enfeksiyonların patogenezinde oksidatif stresin olası rolü yıllardır aktif bir araştırma alanı olmuştur (Oliveira ve Cechini, 2002; Crnogaj ve ark., 2010). Farklı konakçıların intra eritrositik parazitleri olan malarya (Pabón ve ark., 2003; Zhang ve ark., 2014), theileria (Turunç ve Kontaş Aşkar., 2012; Özdek ve ark., 2020), anaplasma (Ergönül ve Kontaş Aşkar, 2009; El-Ashker ve ark., 2015; İlkaya ve ark., 2020) enfeksiyonlarında oksidatif stresin etkinliği ortaya konulmuştur.

Babesiosis farklı hayvan türlerinde yapılan çalışmalarda aneminin patogenezinde eritrosit membranındaki antioksidan aktivite ve/veya seviyelerinde düşüş ve lipit peroksidasyonun meydana gelmesinin etkili olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle

eritrositlerde meydana gelen oksidatif hasarın eritrositlerde osmotik fragilitenin artışına ve dolayısıyla eritrositlerin intravasküler hemolizine neden olduğu bildirilmiştir (Chaudhuri ve ark., 2008; Esmailnejad ve ark., 2012; Crnogaj ve ark., 2017).

Oksidatif stresin yorumlanmasında birçok molekül serum ve plazmada ölçülmekte ve farklı yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bu belirteçlerin tek tek ölçülmesi numunedeki yalnız o molekül hakkında bilgi vermektedir. Antioksidanlar ve oksidanlar kendi içlerinde birbirleri ile etkileşim halinde oldukları ve birlikte çalıştıkları için bir başlarına verecekleri etki birlikte gösterecekleri etkiden daha düşüktür. Antioksidanlar ve oksidanların serum seviyelerinin ayrı ayrı ölçmek hem zaman alıcı hem de yüksek maliyetlidir. Vücuttaki oksidatif stres ve antioksidan seviyeyi yorumlamak için oksidan ve antioksidan moleküllerin tek tek ölçümü yerine tamamının ölçüldüğü yöntemler geliştirilmiştir (Erel, 2004; Erel, 2005; Aktas ve ark., 2017).

Oksidanların plazma veya serum konsantrasyonları laboratuvarında ayrı olarak ölçülebilir, ancak plazmadaki oksidan bileşenlerin etkileri aditif olduğu için TOK ölçümü plazma veya serumun oksidatif durumunu doğru bir şekilde yansıtır (Camkerten ve ark., 2009). Serum TOK seviyesinin analizi Erel (2005), tarafından geliştirilen bir ölçüm yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Kan zararlı serbest radikal reaksiyonlarını önleyen ve/veya engelleyen birçok antioksidan molekül içerir. Ölçüm metodu yakın zamanda belirlenmiş ve geliştirilmiş olan TAK plazmanın toplam antioksidan durumunu yansıtır (Erel, 2004). Bu yöntemde özellikle lipidler, proteinler ve DNA gibi biyomoleküllerin oksidatif hasarına yol açan güçlü serbest radikal reaksiyonlarına karşı etkili olan serum TAK seviyesi ölçülmektedir (Kosecik ve ark., 2005).

Vücuttaki oksidatif stresin tam olarak tespit edilmesi için TAK ve TOK düzeylerinin ölçülmesi yeterli olmayabilir. OSİ oksidatif stresin belirlenmesinde önemli bir parametredir. Plazma redoks durumunun bir indeksi olarak değerlendirilen OSİ oksidatif stres derecesinin kapsamlı bir şekilde değerlendirmesini ortaya koyar. Böylece verilerin yanlış yorumlanmasını önler. OSİ'nin yüksek değerleri oksidan ve antioksidan yapılar arasında tutarsızlığı ortaya koyar (Naviaux, 2014).

Plazma tiyolleri antioksidan ve pro-oksidan özelliklere sahiptirler ve bir sülfhidril (-SH) grubu içerirler. Oksidatif stres durumunda tiyoller reaktif oksijen türleri ve lipid peroksitler ile reaksiyona girerek bu oksidanların düzeylerini azaltır veya etkisizleştirirler. Böylece oksidatif strese bağlı oluşacak doku hasarını önlerler. Sülfidril grubunun oksidasyonu protein oksidasyonunun temel belirtisi niteliğindedir. Tiyol bileşikleri oksidasyon reaksiyonlarına girdiğinde disülfid bağları oluştururlar. Bu nedenle artan oksidatif stres tiyol gruplarının disülfid bağlarına okside olması ile açıklanabilecek redoks durumu üzerinde bir etkiye sahiptir (Değirmençay ve ark., 2021). Erel ve Neşelioğlu (2014), oksidatif stresin yeni bir belirteci olarak tiyol-disülfid dengesinin (TDD) değerlendirilmesinde yeni ve tam otomatik bir yöntem geliştirmişlerdir.

Dinamik tiyol/disülfid denge; zehirsizleştirme, antioksidan savunma, programlanmış hücre ölümü, sinyal iletimi, enzimatik etkinin düzenlenmesi, transkripsiyon ve hücresel sinyal mekanizmalarında görev alır. Organizmadaki dinamik TDD hastalık süreçlerinde oksidatif stresten etkilenebilir. Oksidatif stres seviyesinde artışa sebep olan patolojilerde bu denge disülfid tarafına kayar ve böylece vücudun ana antioksidanlarından biri olan tiyollerin serum seviyesi azalır (Erdoğan ve ark., 2019).

Kanda bulunan proteinlerin büyük bir kısmını oluşturan albüminin en önemli görevi kandaki onkotik basıncı düzenlemesidir. Bunun yanı sıra taşıyıcılık, endojen aminoasitlerin sentezinde kaynak oluşturma ve oksidatif stres durumlarında negatif akut faz reaktan olması gibi görevleri bulunmaktadır (Kırmızıgül ve ark. 2020).

Albümin ROT'un ortadan kaldırılmasından sorumludur. İskemi mevcut olduğunda, albüminin N-terminalinde amino asit dizisinde değişiklikler meydana gelir ve ortaya çıkan yeni protein iskemi ile modifiye edilmiş albümin (İMA) olarak adlandırılır. Albüminin bir türevi olan İMA oksidan bir biyobelirteç olarak kullanılır (Lippi ve Montagnana, 2009). İMA'nın ilk çıkış noktası ve kullanımı akut koroner hastalıkların özellikle miyokard iskemisinin erken tanısı olmasına rağmen daha sonra İMA'nın oluşumunun yalnız miyokardiyumu etkileyen iskemide değil, diğer organları etkileyen iskemi durumları ile oksidatif strese bağlı olduğu saptanmıştır. Çünkü hipoksi, asidoz, serbest radikal hasarı gibi iskemik bir duruma neden olabilecek hastalıklarda serum albüminin N-terminal ucunda meydana gelen yapısal değişiklikler sonucunda albüminin

Co (kobalt), Ni (nikel) ve bakır (Cu) gibi geçiş metallerini bağlama kapasitesi azalmaktadır (Lippi ve ark., 2006).

Yapılan araştırmalarda köpek babesiosisinin farklı sunumlarında TAK, TOK, OSİ, TDD, İMA ve ALB parametrelerinin birlikte değeriendirildiğı bir literatür bulunamamıştır. Ayrıca bu araştırma babesiosisli köpeklerde İMA ve TDD parametreleri temelinde değeriendiren ilk çalışmadır.

Köpeklerin çeşitli inraeritrositik enfeksiyonların patogeneğinde oksidatif stresin rol aldığı bildirilmiştir. Köpeklerde *Rengalia vitalie* enfeksiyonunda yapılan bir çalışmada lipit peroksidasyonunu değeriendirmek için kullanılan tiyobarbitürik asit reaktif madde (TBARS) ve ileri düzey okside protein (AOPP) düzeylerinin paraziteminin derecesine göre yükseldiğı bulunmuştur (França ve ark., 2012).

Murase ve ark. (1996), *Babesia gibsoni* ile enfekte köpek eritrositlerinde oksidatif hasar ve eritrofagositozu araştırdıkları çalışmada eritrosit kültüründe paraziteminin en yüksek seviyeye ulaştığında, eritrositlerdeki hem methemoglobin (metHb) hem de MDA konsantrasyonları ekimin yapıldığı ilk güne ve parazitlenmemiş eritrosit kültürlerine göre önemli artışlar gösterdiğini bulmuşlardır. Ayrıca parazitlenmiş kültürden elde edilen eritrositlerin normal köpeklerden alınan kemik iliğı makrofajları tarafından fagositoza, kontrol kültüründen elde edilen eritrositlere göre daha duyarlı olduğunu ve makrofajların sadece parazitlenmiş eritrositleri değil aynı zamanda parazitlenmemiş eritrositleri de yutmuş olduğunu belirlemişlerdir. Bu sonuçlar, eritrositlerdeki oksidatif hasarın *B. gibsoni*'nin çoğalmasıyla indüklendiğini ve parazitlenmemiş eritrositlerin de *B. gibsoni* tarafından oksidatif strese maruz kaldığını bildirmişlerdir.

Babesia gibsoni ile koenfeksiyon olan ve olmayan *Ehrlichia canis* ile enfekte köpeklerde oksidatif stres üzerine karşılaştırılmalı yapılan bir çalışmada, MDA seviyesi açısından sağılıklı köpekler ve monositik ehrlichiosisli köpekler arasında anlamlı bir fark bulunmazken, koenfeksiyonlu köpeklerde MDA seviyesinin yüksek olduğu bulunmuştur (Kumar ve ark., 2006).

Sarma ve ark. (2015), kene kaynaklı hücre içi hastalıklar ile doğal olarak enfekte köpeklerde hemato-biyokimyasal ve oksidatif stres indekslerini değeriendirmişlerdir.

Çalışmada, ehrlichiosis, babesiosis, anaplasmosis ve hepatozoonosis koenfeksiyonlarında LPO seviyesinin sağlıklı gruba göre anlamlı şekilde arttığını, buna karşın süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktiviteleri ile glutatyon (GSH) seviyesinin azaldığını bulmuşlardır. Sonuç olarak oksidatif stresin köpeklerde bu enfeksiyonların patofizyolojisinde etkili bir role sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Babesia gibsoni'nin neden olduğu klinik babesiosisli köpeklerde eritrosit lipid peroksit ve antioksidan düzeyleri ile hastalığın kandaki demir, çinko ve bakır düzeylerine etkisinin araştırıldığı çalışmada, hasta köpeklerde sağlıklı köpeklerle göre eritrositik antioksidan enzim (SOD ve CAT) aktiviteleri ile LPO seviyesinin önemli ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte iz mineral seviyelerinin önemli ölçüde düşük olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, *B. gibsoni* ile doğal olarak enfekte olmuş köpeklerde oksidatif hasarın geliştiği, düşük kan demir, çinko ve bakır seviyesinin anemi ve oksidatif stres oluşumunda ek bir role sahip olduğu belirtilmiştir (Chaudhuri ve ark., 2008).

Babesia canis (Crnogaj ve ark, 2010) ve *Babesia canis canis* (Crnogaj ve ark., 2015) ile doğal enfekte köpeklerde MDA ölçümü ile oksidatif stresin varlığının araştırıldığı iki farklı çalışmada, babesiosisli köpeklerde MDA konsantrasyonunun kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak oksidatif stresin babesiosisin patofizyolojisinde ve klinik olarak şiddetinde etkili bir role sahip olduğu bildirilmiştir.

Crnogaj ve ark. (2017), oksidatif stresin köpek babesiosisinin şiddeti ve sonucu ile ilişkili olup olmadığını değerlendirmek için yaptıkları diğer bir çalışmalarında kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında, *Babesia canis canis* ile doğal enfekte köpeklerde SOD ve CAT enzim aktivitelerinin yanı sıra TAK seviyesinin önemli ölçüde azaldığını, MDA seviyesinin ise önemli ölçüde arttığını bulmuşlardır. Gruplar arasında GPx enzim aktivitesinde önemli bir fark olmadığını tespit etmişlerdir. Hasta köpeklerde bulunan antioksidan biyo belirteçlerdeki bu önemli azalmanın köpeklerde *B. canis canis* ile doğal enfeksiyonda oksidatif süreç sırasında serbest radikallerin “temizleyicileri” olarak antioksidanların tüketimine bağlı olabileceğini belirtmişlerdir. Sonuç olarak, oksidatif stresin varlığı ile ilişkili ölçülen antioksidan biyo belirteçlerdeki değişikliklerin, babesiosisli köpeklerde hastalığın şiddeti ve sonucunun değerlendirilmesinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Otsuka ve ark. (2001), *B. gibsoni* ile enfekte eritrositlerdeki oksidatif sürecin altında yatan mekanizmayı aydınlatmak için yaptıkları çalışmada, 7 gün boyunca *B. gibsoni*'yi kültürledikleri köpek eritrositlerinde paraziteminin %12,0-13,4'e ulaştığında süperoksit radikal üretiminin kontrol eritrosit kültürüne göre önemli ölçüde arttığını bulmuşlardır. Ayrıca parazitlenmiş eritrosit kültüründe TBARS seviyesinin kontrol eritrosit kültürüyle karşılaştırdıklarında önemli ölçüde arttığını, bununla lipid peroksidasyonunun enfekte eritrositlerde enfekte olmayan eritrositlere göre daha fazla olduğunu gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlar doğrultusunda, *B. gibsoni* ile parazitlenen eritrositlerde parazit tarafından süperoksit radikallerinin artırıldığı buna bağlı olarak lipid peroksidasyonun gelişerek oksidatif hasarı oluşturduğunu belirtmişlerdir.

Bu çalışmada babesiosisli grupta kontrol grubuna göre antioksidan biyobelirteç olan TAK seviyesinde istatistiki olarak anlamlı olacak şekilde azalma olduğu tespit edildi. TAK seviyesindeki bu azalma oksidatif süreç sırasında serbest radikallerin oluşumunu ve bunların sebep olduğu hasarı önlemek için hareket eden antioksidanların tüketimine bağlı olabilir. Bu sonuç babesiosisli grupta TAK ile OSI arasında anlamlı negatif korelasyon bulunması ile desteklenmektedir. Ayrıca yapılan ROC analizi sonucuna göre TAK değişkeninin istatistiki olarak anlamlı olan eğri altında kalan alana sahip olması babesiosisli köpeklerde oksidatif stresin saptanmasında tanısal performansa sahip olduğunu gösterir. *Babesia canis canis* ile doğal olarak enfekte olan köpeklerde TAK düzeyinde azalma olduğunu tespit eden çalışmanın (Crnogaj ve ark., 2017) sonucu bulgumuzu desteklemektedir.

Farklı *Babesia* türleri ile enfekte olan köpeklerde oksidatif durumu belirlemek için ölçülen lipid peroksidasyon ürünleri MDA, LPO ve TBARS düzeylerinin arttığını tespit eden yukarıdaki literatürlerin sonuçları ile uyumlu olacak şekilde, bu çalışmada babesiosisli grupta kontrol grubuna göre serum TOK seviyesinde istatistiki olarak anlamlı olacak şekilde artış olduğu tespit edildi. Artan TOK seviyesi hastalık seyri sırasında aşırı serbest radikal üretimine bağlı olabilir. TOK ile bakılan diğer parametreler arasında korelasyon olmadığı saptandı. Ayrıca yapılan ROC analizi sonucuna göre TOK değişkeninin istatistiki olarak anlamlı olan eğri altında kalan alana sahip olması

babesiosisli köpeklerde oksidatif stresin saptanmasında tanısal performansa sahip olduğunu gösterir.

OSİ değeri reaktif oksidatif metabolitlerin birikimi ile oksidan ve antioksidan belirteçlerin arasındaki dengesizliği ortaya koyar (Pugliese ve ark., 2022). Çalışmamızda babesiosisli grupta anlamlı olacak şekilde TOK seviyesinde artış, TAK seviyesinde azalma olması, yukarıdaki yorumu destekleyecek şekilde babesiosisli grupta, kontrol grubuna göre önem gösterecek şekilde yüksek OSİ değeri elde edilmesiyle sonuçlandı. Ayrıca yapılan ROC analizi sonucuna göre OSİ değişkeninin istatistiki olarak anlamlı olan eğri altında kalan alana sahip olması babesiosisli köpeklerde oksidatif stresin saptanmasında tanısal performansa sahip olduğunu gösterir.

Normal fizyolojik durumlarda antioksidan olan TT ve NT ile oksidan olan DS denge halindedir. TDD olarak bilinen bu sistem oksidatif stresin olduğu çeşitli durumlarda etkilenir. Antioksidan sistemdeki tiyollerin işlevini bilmek çeşitli hastalıklar ve oksidatif stres arasındaki bağlantıyı anlamada giderek daha önemli hale gelmektedir (Erel, 2004). TDD parametreleri (NT, TT, Ds, NT/TT, Ds/NT, Ds/TT) beşeri hekimlikte farklı hastalıkların oksidatif durumunu değerlendirmek için kullanılmasına rağmen, veteriner hekimlik alanında sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Çalışmamızda babesiosisli köpeklerde Erel ve Neşelioğlu (2014), tarafından geliştirilen metot kullanılarak TDD parametrelerinin düzeyi ölçülerek ve hesaplanarak belirlendi. Elde edilen veriler diğer hayvan hastalıklarında elde edilen sonuçlar kullanılarak karşılaştırıldı.

Rubio ve ark. (2017), klinik ve subklinik monositik ehrlichiosis teşhisi konulan köpeklerde sağlıklı köpeklerle karşılaştırdıklarında serum tiyol düzeylerinin önemli ölçüde azaldığını tespit etmişlerdir.

Köpek Gençlik Hastalığı'nda (Distemper) köpeklerde oksidatif stresin değerlendirilmesinde TDD parametre ve iskemi modifiye albümin (İMA) seviyelerinin tanısal değerini araştırmak amacıyla yapılan çalışmada, kontrol grubuna göre Distemper'li köpeklerde rakamsal olarak NT, TT düzeyleri ile NT/TT oranının azaldığı, Ds düzeyi ile Ds/NT ve Ds/TT oranlarının arttığı bulunmuştur. Antioksidan parametrelerin (NT, TT) ve oksidan parametrelerin (Ds, Ds/NT ve Ds/TT) kendi aralarında anlamlı pozitif korelasyon, bununla birlikte oksidan ve antioksidan

parametrelerin birbirleri ile anlamlı negatif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Bu bulgular doğrultusunda Distemper hastalığında TDD parametrelerindeki değişikliklerin oksidanlar lehine olduğu ve bununda oksidatif stresin ve artan ROS üretiminin bir göstergesi olarak kabul edilebileceği sonucuna varılmıştır. Genel olarak artan oksidatif stres artışının saptanması için İMA, Ds/NT ve Ds/TT'nin tanısal performanslarının olduğu, fakat İMA'nın daha etkin olduğu belirtilmiştir (Değirmençay ve ark., 2021).

Pugliese ve ark. (2022), *Ehrlichia canis* ile enfekte olmuş köpeklerde yaptıkları çalışmada plazma tiyol seviyesini önemli derecede düşük bulmuşlardır. Bununla birlikte araştırmacılar yaptıkları farklı bir çalışmalarında ise leishmaniasisli köpeklerde tiyol seviyesini önemli derecede yüksek bulmuşlardır (Pugliese ve ark., 2021). Tiyol seviyesi açısından elde edilen bu iki farklı sonucun hastalıkların seyrinde meydana gelen farklı mekanizmalarla ilgili olabileceği belirtilmiştir (Pugliese ve ark., 2022).

Camkerten ve ark. (2009), sarkoptik uyuzlu köpeklerde sağlıklı köpeklere göre tiyol seviyesini anlamlı şekilde düşük olduğunu bulmuşlardır.

Yukarıdaki araştırmacıların sonuçlarından farklı olarak bu çalışmada kontrol grubu ile karşılaştırıldığında babesiosisli grupta istatistiki açıdan anlamlı olmayacak şekilde TDD parametrelerinden antioksidan belirteçler olan TT ve NT seviyeleri ile NT/TT oranının azaldığı, bununla birlikte oksidan belirteçler olan Ds seviyesi ile Ds/NT ve Ds/TT oranlarının arttığı tespit edildi. Organizmada oluşan serbest radikaller tiyollerin oksidasyonuna neden olarak disülfid bağı oluşturmalarına neden olurlar. Bu nedenle tiyol seviyesindeki azalma ve disülfid seviyesindeki artış serbest radikal üretimindeki artıştan kaynaklanmış olabilir. Bu sonuç Ds/NT oranı ile NTseviyesi, TT seviyesi ve NT/TT oranı arasında anlamlı negatif korelasyon bulunması ile desteklenmektedir. Aynı zamanda antioksidan parametrelerin kendi aralarında anlamlı pozitif korelasyon gösterdiği tespit edildi. Ayrıca yapılan ROC analizi sonucuna göre NT, TT, Ds/TT, NT/TT, Ds/NT ve Ds değişkenlerinin istatistiki olarak anlamlı olmayan eğri altında kalan alana sahip olmaları babesiosisli köpeklerde oksidatif stresin saptanmasında tanısal performansa sahip olmadıklarını gösterir.

Oksidatif stres ile modifiye olmuş albüminin bir şekli olan İMA beşeri hekimlikte ilk olarak miyokard iskemisinin bir belirteci olarak tanımlanmıştır. Ancak şimdi

serebrovasküler hastalıklar, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, kronik karaciğer hastalıkları, obstrüktif uyku apnesi ve pulmoner hastalıklar gibi kalp dışı iskemi ve oksidatif stres durumlarında yükseldiği gösterilmiştir (Ogan ve ark., 2020).

Araştırdığımız kadarıyla köpeklerde oksidatif stresin değerlendirilmesinde İMA düzeyinin kullanımına ilişkin bir çalışma bulunmaktadır (Değirmençay ve ark., 2021). Belirtilen bu çalışmada Distemper’li köpeklerde İMA seviyesinin sağlıklı köpeklere göre önemli olacak şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Yukarıda belirtilen araştırmanın sonucundan farklı olarak bu çalışmada İMA seviyesi açısından kontrol grubu ile babesiosisli grup arasında istatistiki olarak fark olmadığı tespit edildi. İMA ile bakılan parametreler arasında korelasyon olmadığı belirlendi. Ayrıca yapılan ROC analizi sonucuna göre İMA değişkeninin istatistiki olarak anlamlı olmayan eğri altında kalan alana sahip olması babesiosisli köpeklerde oksidatif stresin saptanmasında tanısal performansa sahip olmadığını gösterir.

Sağlıklı köpek ve kedilerin plazmasındaki proteinin %35-50'sini oluşturan (Cerón ve ark., 2005) albüminin serum seviyesinin azalması hastalık durumunda sentezinin azalması, kaybının artması ve vücutta dağılımının bozulmasına bağlı olarak gelişir. Diğer yandan albüminin yıkımlanması doku hasarı ve yangısal durumlarda artar. Organizmada oluşan akut faz yanıtı (AFY) bağlı olarak serum albümin seviyesinde azalma meydana gelir (Kırmızıgül ve ark., 2020). Negatif akut faz protein olan albümin, ROS'un ortadan kaldırılmasından sorumludur (Lippi ve Montagnana, 2009). Kinoshita ve ark. (2017), artan oksidatif stresin azalmış albümin seviyeleri ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Genel olarak çeşitli araştırmacılar tarafından babesiosisli köpeklerde serum albümin seviyesinin azaldığı bildirilmiştir (Lobetti ve ark., 2000; Camacho ve ark., 2005; Yadav ve ark. 2011; Bilwal ve ark., 2017; Ullal ve ark., 2018; Kırmızıgül ve ark., 2020). Tóthová ve ark., (2020) *Babesia gibsoni* ve *Babesia canis* ile doğal olarak enfekte olmuş köpeklerde serum proteinlerinin elektroforetik farklılıklarını araştırdıkları çalışmada, albümin seviyesinin *B. gibsoni* ile enfekte olmuş köpeklerde, *B. canis* ile enfekte olmuş köpeklerden daha düşük olduğunu bulmuşlardır. Diğer yandan Yogeshpriya ve ark. (2018), *B. gibsoni* ile doğal olarak enfekte olmuş köpekler ile sağlıklı köpekler arasında albümin seviyesi açısından fark olmadığını bulmuşlardır.

Yukarıdaki literatür sonuçları ile uyumlu olacak şekilde bu çalışmada, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında babesiosisli grupta istatistiki olarak anlamlı olacak şekilde albümin seviyesinin azaldığı tespit edildi. Albümin seviyesindeki bu azalmanın akut faz reaksiyona, karaciğer ile böbrek fonksiyon bozukluğuna ve yetersiz protein alımından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. ALB ile bakılan diğer parametreler arasında korelasyon olmadığı saptandı. Ayrıca yapılan ROC analizi sonucuna göre ALB değişkeninin istatistiki olarak anlamlı olan eğri altında kalan alana sahip olması babesiosisli köpeklerde oksidatif stresin saptanmasında tanısallık performansına sahip olduğunu gösterir.

Sonuç olarak; babesiosisli köpeklerde TAK, TOK, OSİ ve ALB parametrelerindeki değişikliklerin ve ROC eğrisi altında kalan alanlarının istatistik olarak anlamlı olması bu parametrelerin babesiosisde artan oksidatif stresi belirlemede etkin parametreler olduğunu gösterir. Bu çalışmanın temel amaçlarından biri babesiosisli köpeklerde oksidatif stresin değerlendirilmesinde TDD parametreleri ile İMA'nın kullanımını ortaya koymaktır. Bu bağlamda yapılan analizler sonucu TDD parametrelerinin ve İMA'nın oksidatif stresin saptanmasında etkili olmadıkları belirlendi. Ancak İMA ile karşılaştırıldığında TDD parametrelerindeki değişikliklerin daha belirgin ve ROC eğrisi altında kalan alanların (Ds hariç) daha büyük olması, babesiosisli köpeklerde oksidatif stresin değerlendirilmesinde TDD parametrelerinin İMA'dan daha etkili olduklarını gösterir. Bunu destekleyecek daha ileri çalışmalar yapılması öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aktas MS, Kandemir FM, Kirbas A, Hanedan B, Aydın M A. Evaluation of oxidative stress in sheep infected with *Psoroptes ovis* using total antioxidant capacity, total oxidant status, and malondialdehyde level. J Vet Res. 2017;61(2):197-201.
- Altay K, Aktaş M, Dumanlı N. Köpek ve kedilerde görülen parazit hastalıklar. Özcel MA, İnci A, Köroğlu E, Karaer Z, Eren H, Yukarı BA, Dumanlı N, Aydın L, Yıldırım A editörler. Veteriner hekimliğinde parazit hastalıkları, Cilt 2. İzmir: Meta Basım Matbaacılık; 2016.
- Anonim. [<https://synevo.com.tr/tr/Oksidatif-Stres-Paneli>]. [Erişim Tarihi: Eylül 2022].
- Bar-or D, Curtis G, Rao N, Bampos N, Lau E. Characterization of the Co⁺² and Ni⁺² binding amino-acid residues of the N-terminus of human albumin. Eur J Biochem. 2001;268(1):42-7.
- Bar-Or D, Lau E, Rao N, Bampos N, Winkler JV, Curtis CG. Reduction in the cobalt binding capacity of human albumin with myocardial ischemia. Ann Emerg Med. 1999;34(4):56.
- Bar-Or D, Lau E, Winkler JV. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia—a preliminary report. J Emerg Med. 2000;19(4):311-5.
- Baneth G. Antiprotozoal treatment of canine babesiosis. Vet Parasitol. 2018;254:58-63.
- Birkenheuer AJ. Babesiosis. 2021. [Erişim Tarihi 26 Ekim 2021]. Erişim adresi: <https://veteriankey.com/babesiosis/>
- Bilwal AK, Mandali GC, Tandel FB. Clinicopathological alterations in naturally occurring *Babesia gibsoni* infection in dogs of Middle-South Gujarat, India. Vet World. 2017;10:1227-32.
- Birkenheuer AJ, Levy MG, Breitschwerdt EB. Development and evaluation of a semi nested PZR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. J Clin Microbiol. 2003;41:4172-7.
- Bowen RS, Moodley J, Dutton MF, Theron AJ. Oxidative stress in preeclampsia. Acta Obstet Gynecol Scand. 2001;80(8):719-25.
- Büyükcü N, Yiğitbaşı T. Reaktif oksijen türleri ve obezitede oksidatif stres. MÜSBED 2015;5(3):197-203.
- Camacho AT, Guitian FJ, Pallas E, Gestal JJ, Olmeda S, Goethert H, et al. Serum protein response and renal failure in canine *Babesia annae* infection. Vet Res. 2005;36(5-6):713-22.
- Camkerten I, Sahin T, Borazan G, Gokcen A, Erel O, Das A. Evaluation of blood oxidant/antioxidant balance in dogs with sarcoptic mange. Vet Parasitol. 2009;161(1-2):106-9.
- Can Ü, Yosunkaya Ş. İskemide yeni bir marker: İskemi modifiye albumin. Koşuyolu Heart J. 2017;20(2):148-52.

- Cerón JJ, Eckersall PD, Martínez-Subiela S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol*. 2005;34:85-99.
- Chaudhuri S, Varshney JP, Patra RC. Erythrocytic antioxidant defense, lipid peroxides level and blood iron, zinc and copper concentrations in dogs naturally infected with *Babesia gibsoni*. *Res Vet Sci*. 2008;85:120-4.
- Clemens MR, Waller HD. Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem Phys Lipids*. 1987;45(2-4):251-68.
- Crnogaj M, Cerón JJ, Šmit I, Kiš I, Gotić J, Brkljačić M, et al. Relation of antioxidant status at admission and disease severity and outcome in dogs naturally infected with *Babesia canis canis*. *BMC Vet Res*. 2017;13(1):114.
- Crnogaj M, Kiš I, Kučer N, Šmit I, Mayer I, Brkljačić M, et al. Lipid peroxidation in dogs naturally infected with *Babesia canis canis*. *Vet Arhiv*. 2015;85:37-48.
- Crnogaj M, Petlevski R, Mrljak V, Kiš I, Torti M, Kučer N, et al. Malondialdehyde levels in serum of dogs infected with *Babesia canis*. *Vet Med (Praha)*. 2010;55:163-71.
- Değirmençay Ş, Çamkerten G, Çamkerten İ, Aktaş MS. An investigation of thiol/disulfide homeostasis and ischemia-modified albumin levels to assess the oxidative stress in dogs with canine distemper. *Veterinarski Arhiv*. 2021;91(1):39-49.
- Demircan E. Romatoid Artrit Total Antioksidan Status (TAS), Total Oksidan Status (TOS), İskemi Modifiye Albumin (İMA) Düzeylerinin Hastalık Aktivitesi ve İnsülin Direnci ile İlişkisi [Tıpta Uzmanlık tezi]. Samsun: Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2013.
- Dündar Y, Aslan R. Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar. Afyon: Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları; 2000.
- Eichenberger RM, Štefanić S, Naucke TJ, Šarkūnas M, Zamokase G, Grimma F, et al. An ELISA for the early diagnosis of acute canine babesiosis detecting circulating antigen of large *Babesia* spp. *Vet Parasitol*. 2017;243:162-8.
- El-Ashker M, Hotzel H, Gwida M, El-Beskawy M, Silaghi C, Tomaso H. Molecular biological identification of babesia, theileria, and anaplasma species in cattle in Egypt using PCR assays, gene sequence analysis and a novel DNA microarray. *Vet Parasitol*. 2015;30(3-4):329-34.
- Erdoğan H, Çamkerten İ, Çamkerten G, Ural K, Erdoğan S, Günel İ, et al. The effect of hot-iron disbudding on thiol-disulphide homeostasis in calves. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2019;25:335-9.
- Erel O, Neselioglu S. A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis. *Clin Biochem*. 2014;47(18):326-32.
- Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 2005;38(12):1103-11.
- Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*. 2004;37(4):277-5.

- Ergönül S, Kontaş Aşkar T. Anaplasmosis'li sığırlarda ısı şok protein (HSP), malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO) ve interlökin (IL-6, IL-10) düzeylerinin araştırılması. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2009;15(4):575-9.
- Esmailnejad B, Tavassoli M, Asri-Rezaei S, Dalir Naghadeh B. Evaluation of antioxidant status and oxidative stress in sheep naturally infected with *Babesia ovis*. Vet Parasitol. 2012;185:124-30.
- França RT, Da Silva AS, Costa MM, Paim FC, Paim CB, Thomé GR, et al. Relationship between oxidative stress and clinical-pathological aspects in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. Res Vet Sci. 2012;93(3):1309-13.
- Furlanello T, Fiorio F, Caldin M, Lubas G, Gallego-Solano L. Clinico pathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form babesia from dogs of northeastern Italy. Vet Parasitol. 2005;134:77-85.
- Ghisellia A, Serafinia M, Natellaa F, Scaccinia C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. Free Radic Biol Med. 2000;29(11):1106-14.
- Gökçe E, Kırmızıgül AH, Taşçı GT, Uzlu E, Gündüz N, Vatansever Z. Türkiye'de köpeklerde *Babesia canis canis* 'in klinik ve parazitolojik olarak ilk tespiti. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2013;19:717-20.
- Gultekin M, Ural K, Pasa S, Balıkcı C, Asıcı GSE. Oxidative status and lipid profile in mono and co-infection with canine monocytic ehrlichiosis. Med Weter. 2017;73(12):797-801.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd ed. New York: Oxford University Press. 1999;10-121.
- Irwin PJ. Babesiosis and cytauxzoonosis. In: Shaw SE, Day MJ, Editors. Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat. London: Manson Publishing/The Veterinary Press; 2005.
- Irwin PJ. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. Parasit Vectors. 2009;2(1):4.
- İlkaya S, Değer Y, Oğuz B, Özdek U. Investigating erythrocyte membrane lipid and protein oxidation with Na⁺/K⁺ATPase activity in caprine anaplasmosis. LAR. 2020;26(5):231-7.
- İnci A, Düzlü Ö, İça A. Babesiidae. Veteriner protozooloji, Karaer Z, Dumanlı N, editörler. Ankara: Medisan Yayınevi; 2010.
- Kancı Bozoğlu B. Spektrofotometrik Metotla İnsan Serum Albümin Proteini ile Neohesperidin Dihidrokalbon ve Maprotilin Hidroklorür Arasındaki Etkileşimlerin İncelenmesi [Yüksek Lisans tezi]. Antalya: Akdeniz Üniversitesi; 2012.
- Karabulut H, Gülay M Ş. Antioksidanlar. MAE Vet Fak Derg. 2016;1(1):65-76.
- Kırmızıgül AH, Erkiş EE, Merhan O, Öğün M, Ölmez N, Taşçı GT, et al. The serum amyloid-A, haptoglobin, ceruloplasmin and albumin levels in dogs which are infected with *Babesia canis*. Kocatepe Vet J. 2020;13(2):219-23.

- Kinoshita H, Watanabe K, Azma T, Feng G, Akahori T, Hayashi H, et al. Human serum albumin and oxidative stress in preeclamptic women and the mechanism of albumin for stress reduction. *Heliyon*. 2017;3(8):e00369.
- Kosecik M, Erel O, Sevinc E, Selek S. Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. *Int J Cardiol*. 2005;100:61-4.
- Kumar A, Varshney JP, Patra RC. A comparative study on oxidative stress in dogs infected with *Ehrlichia canis* with or without concurrent infection with *Babesia gibsoni*. *Vet Res Commun*. 2006;30:917-20.
- Lee SH, Blair IA. Oxidative DNA damage and cardiovascular disease. *Trends Cardiovas Med*. 2001;11:148-155.
- Lippi G, Montagnana M, Guidi GC. Albumin cobalt binding and ischemia modified albumin generation: an endogenous response to ischemia? *Int J Cardiol*. 2006;108(3):410-11.
- Lippi G, Montagnana M. Ischemia-modified albumin in ischemic disorders. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2009;15(2):137.
- Lobetti RG, Mohr AJ, Dippenaar T, Myburgh E. A preliminary study on the serum protein response in canine babesiosis. *J S Afr Vet Assoc*. 2000;71(1):38-42.
- Mahalingaiah MKC, Asoor M, Thimmaiah RP, Narayanaswamy HD, Mukartal SY, Elattuvalappil AM, et al. Prevalence of canine babesiosis in different breeds of dogs in and around bengaluru. *Adv Anim Vet Sci*. 2017;5(3):140-4.
- Matjila PT, Penzhorn BL, Bekker CP, Nijhof AM, Jongejan F. Confirmation of occurrence of *Babesia canis vogeli* in domestic dogs in South Africa. *Vet Parasitol*. 2004;122:119-25.
- Murase T, Ueda T, Yamato O, Tajima M, Maede Y. Oxidative damage and enhanced erythrophagocytosis in canine erythrocytes infected with *Babesia gibsoni*. *J Vet Med Sci*. 1996;58:259-61.
- Naviaux RK. Metabolic features of the cell danger response. *Mitochondrion*. 2014;16:7-17.
- Ogan N, Evrin T, Çandar T, Alhan A, Gülhan M. Is ischemia modified albumin a good marker in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease? *EuRJ*. 2020;6(5):388-94.
- Oliveira FJA, Cechini R. Oxidative stress of liver in hamsters infected with *Leishmania (L.) chagasi*. *J Parasitol*. 2002;86:1067-72.
- Otsuka Y, Yamasaki M, Yamato O, Maede Y. Increased generation of superoxide in erythrocytes infected with *Babesia gibsoni*. *J Vet Med Sci*. 2001;63(10):1077-81.
- Özdek U, Oğuz B, Kömüroğlu U, Değer Y. Determination of the levels of serum oxidative indicator, cytokine and some biochemical parameters in horses naturally infected with *Theileria equi*. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*. 2020;67:257-63.
- Pabón A, Carmona J, Burgos LC, Blair S. Oxidative stress in patients with non-complicated malaria. *Clin Biochem*. 2003;36(1):71-8.

- Pugliese M, Biondi V, Merola G, Landi A, Passantino A. Oxidative stress evaluation in dogs affected with canine monocytic ehrlichiosis. *Antioxidants*. 2022;11(2):328.
- Pugliese M, Sfacteria A, Oliva G, Falcone A, Gizzarelli M, Passantino A. Clinical Significance of R-OOHs, OXY, SHp and HMGB-1 in canine leishmaniosis. *Animals*. 2021;11(3):754.
- Rubio CP, Yilmaz Z, Martínez-Subiela S, Kocaturk M, Hernández-Ruiz J, Yalcin E, et al. Serum antioxidant capacity and oxidative damage in clinical and subclinical canine ehrlichiosis. *Res Vet Sci*. 2017;115:301-6.
- Sarma K, Mondal D, Saravanan M, Mahendran K. Evaluation of haemato-biochemical and oxidative indices in naturally infected concomitant tick borne intracellular diseases in dogs. *Asian Pac J Trop Dis*. 2015;5(1):60-6.
- Selçin Ö, Oğuz B. Investigation of *Babesia* spp. in stray dogs in Van Province by polymerase chain reaction. *KOU Sag Bil Derg*. 2022;8(2):156-61.
- Solano-Gallego L, Baneth G. Babesiosis in dogs and cats expanding parasitological and clinical spectra. *Vet Parasitol*. 2011;181:48-60.
- Solano-Gallego L, Sainz Á, Roura X, Estrada-Peña A, Miró G. A review of canine babesiosis: the European perspective. *Parasit Vectors*. 2016;9(1):336.
- Tóthová, C, Karasová M, Blaňarová L, Fialkovičová M, Nagy O. Differences in serum protein electrophoretic pattern in dogs naturally infected with *Babesia gibsoni* and *Babesia canis*. *Sci Rep*. 2020;10:18904.
- Tufan A. Buzağı Koksidiozisinde Lipid Peroksidasyon Düzeyi ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri [Yüksek Lisans tezi]. Kayseri: Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2008.
- Turell L, Radi R, Alvarez B. The thiol pool in human plasma: The central contribution of albumin to redox processes. *Free Radic Biol Med*. 2013;65:244-53.
- Turunç V, Konaş Aşkar T. The determination of oxidative stress by paraoxonase activity, heat shock protein and lipid profile levels in cattle with theileriosis. *Kafkas Üni Vet Fak Derg*. 2012;18(4):647-51.
- Uilenberg G. *Babesia*-a historical overview. *Vet Parasitol*. 2006;138:3-10.
- Ullal T, Birkenheuer A, Vaden S. Azotemia and proteinuria in dogs infected with *Babesia gibsoni*. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2018;54(3):156-60.
- Ulutaş B, Bayramlı G, Alkim Ulutaş B, Karagenç T. Serum concentration of some acute phase proteins in naturally occurring canine babesiosis: A preliminary study. *Vet Clin Pathol*. 2005;34:144-7.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39:44-84.
- Vishwakarma P, Nandini MK. Overview of canine babesiosis. S. Mani, S.O. Bekoe, R.K. Adosraku, P.K. Ramkumar editors. *Veterinary Medicine and Pharmaceuticals*. United Kingdom: IntechOpen; 2019.

Yadav R, Gattani A, Gupta SR, Sharma CS. Jaundice in dogs associated with babesiosis—a case report. *Int J Agric Vet Med Sci*. 2011;5:3-6.

Yogeshpriya S, Sivakumar M, Saravanan M, Venkatesan M, Veeraselvam M, Jayalakshmi K, et al. Clinical, haemato-biochemical and ultrasonographical studies on naturally occurring *Babesia gibsoni* infection in dogs. *J Entomol Zool Stud*. 2018;6:1334-37.

Zhang G, Oleksii AS, Siew-Kim K, Ruth A, Wiertsema S, Augusto JN, et al. Plasma advanced oxidative protein products are associated with anti-oxidative stress pathway genes and malaria in a longitudinal cohort. *Malar J*. 2014;13:134.



TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tez Başlığı / Konusu	Babesiosisli Köpeklerde Tiyo-Disülfid Dengesinin, Total Oksidan-Antioksidan ve İskemi Modifiye Albümin Seviyelerinin Araştırılması			
İntihal taraması yapılan bölümler ve sayfa sayıları				
Kapak sayfası	Giriş	Ana bölümler	Sonuç bölümleri	Toplam sayfa sayısı
4	2	11	18	35
İntihal taraması yapılan program			Taramanın yapıldığı tarih	Benzerlik oranı %
Turnitin			21 / 11 / 2022	%12
*Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:				
- Kabul ve onay sayfası hariç, - Teşekkür hariç, - İçindekiler hariç, - Simge ve kısaltmalar hariç, - 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words) - Gereç ve yöntemler hariç, - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - Tezden çıkan yayınlar hariç,				
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihali içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabulettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.				
Gereğini bilgilerinize arz ederim.			Mustafa TARHAN Öğrencinin Adı Soyadı İmza	
Öğrencinin Adı Soyadı	Mustafa TARHAN			
Anabilim Dalı	BİYOKİMYA (VETERİNER)			
Öğrenci No	20930001001			
Programı	☒ Yüksek Lisans ☐ Doktora			
DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR Prof. Dr. Yeter DEĞER (Unvan, Ad Soyad, İmza)			ENSTİTÜ ONAYI UYGUNDUR Prof. Dr. Semiha DEDE (Unvan, Ad Soyad, İmza)	