



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
VBY-YL-2013-0002

LEİSHMANİASİSLİ KÖPEKLERDE KEMİK METABOLİZMASININ ARAŞTIRILMASI

Biyokimyager
Murat ARI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr.Sema ERTUĞ

AYDIN – 2013

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
VBY-YL-2013-0002**

**LEISHMANİASİSLİ KÖPEKLERDE KEMİK
METABOLİZMASININ ARAŞTIRILMASI**

**Biyokimyager
Murat ARI**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK**

**İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr.Sema ERTUĞ**

AYDIN – 2013

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Murat ARI tarafından hazırlanan “Leishmaniasis’li Köpeklerde Kemik Metabolizmasının Araştırılması” başlıklı tez, 06/06/2013 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı ve Soyadı :

1- Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK

2- Prof. Dr. Sema ERTUĞ

3- Prof. Dr. Funda KIRAL

4- Prof. Dr. Hatice ERTABAKLAR

5- Yrd. Doç Dr. Dide KILINÇ

Üniversitesi :

ADÜ Veteriner Fakültesi

ADÜ, Tıp Fakültesi

ADÜ, Veteriner Fakültesi

ADÜ, Tıp Fakültesi

ADÜ, ASYO

İmzası:



Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans Tezi Enstitü Yönetim Kurulunun..... Sayılı kararıylatarihinde onaylanmıştır.

Prof.Dr.Sacide KARAKAŞ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Leishmaniasis tedavi edilmediği durumlarda deri formundan, ölüme yol açabilen iç organları etkileyen formuna kadar geniş bir yerleşim gösteren enfeksiyöz, protozoal bir hastalıktır.

Vitamin D yağda eriyen vitaminler arasında bulunan, hormon benzeri fonksiyonları olan bir grup steroldür. Vitamin D, mineral dengesinde ve kemik oluşumunda önemli bir düzenleyicidir. Vitamin D kemik sağlığının önemli bir belirleyicisi olarak kabul edilir. Vitamin D eksikliğinde oturuş şeklinde dengesizlik, kas güçsüzlüğü ve kırık riski artar. Deride yapılan veya diyetle alınan vitamin D₂ veya D₃ biyolojik olarak aktif değildir. Dolaşımda bulunan vitamin D, vitamin D bağlayıcı protein ile karaciğere taşınarak karaciğerdeki 25-hidroksilaz enzimi ile 25-OH-D₃'e dönüştürülmektedir. Vitamin D düzeyinin belirlenmesinde 25-OH-D₃ düzeyine bakılmalıdır. 25-OH-D₃ yarı ömrü 2-3 hafta olan major formdur. Vitamin D kalsiyum dengesinin sağlanmasında önemli rol oynar. Kalsiyumun kemik oluşumunda, hormon salınımında, kas kasılmasında, glikojen metabolizmasında önemli fonksiyonları vardır. Bu çalışmanın amacı leishmaniasisli köpeklerde vitamin D, Ca, P, ALP seviyelerinin sağlıklı köpeklere göre nasıl değiştiğini saptamaktır. Özet olarak, leishmaniasis hastalığının köpeklerde kemik metabolizmasına etkisini araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Araştırma, “Leishmaniasisli Köpeklerde Kemik Metabolizmasının Araştırılması” isimli ve VTF-12041 kodlu proje olarak, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenerek gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY SAYFASI	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. Leishmania'nın Tarihçesi.....	2
3. Leishmania Taksonomisi.....	4
4. Leishmania Morfolojisi.....	4
4. 1. Amastigot.....	5
4. 2. Promastigot.....	6
5. Leishmaniasis'in Yaşam Döngüsü.....	6
6. Leishmaniasis'in Epidemiyolojisi.....	7
7. Leishmaniasis'in Tanı Yöntemleri.....	8
7. 1. Direkt Tanı.....	8
7. 2. İndirekt Tanı.....	9

7. 2. 1. Elisa.....	9
7. 2. 2. IFA.....	9
7. 2. 2. 1. Doğrudan Fluoresan Antikor Tekniği (DFAT)	10
7. 2. 2. 2. İndirekt Fluoresan Antikor Tekniği (IFAT)	10
7. 2.3. Western Blotting	10
7. 2. 4. Direkt Aglütinasyon Testi (DAT).....	11
7. 2. 5. İmmunokromatografik Testler (Hızlı Tanı Testleri).....	11
7. 3. Moleküler Biyolojik Yöntemler.....	11
7.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	11
8. Klinik.....	12
9. Tedavi.....	12
10. Korunma.....	13
10.1. Vektör ile İlgili Kontrol Yöntemleri.....	13
10.2. Rezervuar ile İlgili Kontrol Yöntemleri.....	14
10.3. Hastalarla İlgili Kontrol Yöntemleri.....	14
11. Kalsiyum ve Fosfor Metabolizması.....	14
11. 1. Mineral ve Kemik Metabolizmasını Düzenleyen Hormonlar.....	16
11. 1. 1. Paratiroid Hormon (PTH)	16
11. 1. 2. Kalsitonin.....	17
11.1.3. Vitamin D.....	18
12. Osteokalsin	20
13. Alkale Fosfataz (ALP).....	21

2. GEREÇ VE YÖNTEM	23
2.1. Materyal Toplanması ve Örneklerin Hazırlanması.....	23
2.2. Kullanılan Cihazlar.....	23
2.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	23
2.4. IFA.....	24
2.4.1. Yöntemin Uygulanması.....	24
2.4.2. Testin Yapılışı.....	25
2.4.3. Sonuçların Yorumlanması ve Değerlendirilmesi.....	26
2.5. Yöntemler.....	27
2.5.1. Kan Serumunda Kalsiyum Miktarının Glyoxal-Bis Metoduyla Tayini.....	27
2.5.2. İnorganik Serum Fosfatın Kalay Klorid Kullanarak Belirlenmesi.....	28
2.5.3. 25-Hidroksi Vitamin D Tayini.....	29
2.5.4. Alkalin Fosfataz'ın (ALP) Kantitatif Tayini.....	32
2.5.5. İstatiksel Analizler.....	33
3. BULGULAR.....	34
4. TARTIŞMA.....	36
5. SONUÇ.....	46
ÖZET.....	47
SUMMARY.....	48
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ.....	60
TEŞEKKÜRLER.....	61

SİMGELER VE KISALTMALAR

WHO :	Dünya Sağlık Örgütü
VL :	Visceral Leishmaniasis
Can VL:	Kanin Visceral Leishmaniasis
KL :	Kutanöz Leishmaniasis
WOAH:	Dünya Hayvan Sağlık Örgütü
ALT :	Alanin Aminotransferaz
GGT :	Gama Glutamiltransferaz
ALP :	Alkalen Fosfataz
AST :	Aspartat Aminotransferaz
PCR :	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
IFAT :	İndirekt Floresan Antikor Testi
DFAT :	Doğrudan Floresan Antikor Testi
ELISA:	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
PZR :	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
GH :	Büyüme Hormonu
PTH :	Paratiroid Hormon
CT :	Kalsitonin
Vit D :	Vitamin D
IgG :	İmmunoglobulin G
IgM :	İmmunoglobulin M

ÇİZELGELER

Çizelge 1. <i>Leishmania</i> Seropozitif 20 Köpeğin IFA Test Sonuçları	34
Çizelge 2. <i>Leishmania</i> Seropozitif ve Seronegatif Köpeklerin 25-OH-D ₃ , ALP, Ca ve P Sonuçları	34

ŞEKİLLER

Şekil 1. <i>Leishmania infantum</i> 'un amastigot formu	5
Şekil 2. <i>Leishmania infantum</i> 'un promastigot formu	6
Şekil 3. Ergokalsiferol (Vitamin D ₂ 'nin provitamini)	19
Şekil 4. Kolekalsiferol (Vitamin D ₃ 'ün provitamini)	19
Şekil 5. Vitamin D ₃ 'ün metabolizması ve fonksiyonu	20
Şekil 6. P standart eğrisi	29
Şekil 7. 25-OH-D ₃ kalibrasyon eğrisi	31
Şekil 8. Serumların 25-OH-D ₃ , ALP, Ca, P düzeyleri	35

GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) belirlediği zoonoz hastalıkları arasında en önemlilerinden biri olarak kabul edilen leishmaniasisin, özellikle köpekleri, insanları ve rodentleri etkileyen başta Akdeniz Bölgesi, Afrika, Asya, Orta ve Güney Amerika olmak üzere dünyanın birçok yerinde yaygın olarak bulunan kendiliğinden iyileşebilen deri formundan (kutanöz leishmaniasis, şark çıbanı), tedavi edilmediği durumlarda ölüme yol açabilen iç organları etkileyen formuna (visseral leishmaniasis) kadar geniş bir yerleşim gösterebilen, genellikle ölümcül seyreden enfeksiyöz, protozoal bir hastalıktır. Köpekler visseral formun rezervuarı olduklarından, kompleks klinik özellikler içeren hastalığın erken dönemde teşhisinin, leishmaniasisin kontrolünde önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir (Ciaramella ve ark 1997, Desjeux 2001, Papadopoulou ve ark 2005).

Köpeklere visseral leishmaniasis (CanVL) etkeni, vektör *Phlebotomus*'ların kan emmesi ile bulaşır. Köpeklerde etken tüm vücuda yayılmadan ve semptomlar görülmeden önce, lokal bir deri yangısı gelişir. Konakçının immun durumuna bağlı olarak belirgin klinik belirtilerin ortaya çıkması bir aydan yedi yıla kadar değişir. Hastalığa yakalanan hayvanların immun yanıtına bağlı olarak hastalığın seyri asemptomatik veya semptomatik olabilmektedir. İmmun yanıtın güçlü olmasına göre hastalığın seyri asemptomatik olarak seyredebilmektedir (Ak ve ark 1995, Desjeux ve ark 2004).

CanVL'de genel patolojik olay, parazitin girdiği dokuda makrofajların toplanması, proliferasyonu sonucu ana dokunun yerini almasıdır. *Leishmania* paraziti kan monositleri, histiyositler, makrofajlar, epiteloid hücreler, karaciğerde Kupffer hücreleri, dalakta kırmızı pulpa hücreleri, kemik iliği, bağırsak duvarının ve lenfoid dokunun mononükleer fagositik hücreleri içerisinde çoğalarak; splenomegali ve hepatomegaliye, kemik iliğinde genellikle hiperplazi ve diseritropoezise, lenfadenopatiye neden olur. Dalaktaki hipertrofiye bağlı olarak ortaya çıkan splenomegali sonucunda eritrositlerin, granülositlerin ve trombositlerin kısa sürede yıkımına ince bağırsaklarda özellikle peyer plaklarının etrafında bulunan submukozanın amastigotlu makrofajlarca istilasına bağlı malabsorbsiyon, diyare ve albumin kaybının sıklıkla meydana gelebileceği belirtilmektedir (Buracco ve ark 1997, Engwerda ve Kaye 2000).

CanVL'de laboratuvar bulguları hastalığın seyri, safhası ve şiddetine göre değişiklikler gösterebilir. Hastalıkta görülen başlıca laboratuvar bulguları, hiperproteinemi, hiperglobulinemi, hipoalbuminemi, albumin / globulin oranında azalma, nonregeneratif anemi, trombositopeni, lökopeni, ALT, GGT ve ALP aktivitesinde artış, üre ve kreatin düzeyinde artış, hafif veya şiddetli proteinuridir (Ak ve ark 1995).

Alkalem fosfataz (ALP) aktivitesi kemik hastalıklarında en sık kullanılan biyokimyasal göstergelerden birisidir. Leishmaniasisli köpeklerin laboratuvar bulgularında görülen ALP düzeyindeki değişimler, leishmaniasisin kemik deformasyonuna neden olabileceğini düşündürmektedir (Çetiner ve ark 2001, Ecer ve ark 2005). Bu bilgiler ışığında bu çalışmada leishmaniasisin kemik metabolizmasını nasıl etkilediğinin araştırılması amaçlanmıştır. Kemik metabolizmasının araştırılmasında Vitamin D, ALP, Ca ve P genellikle birlikte değerlendirilmektedir. Aynı zamanda 25-OH-D₃'ün immun sistem ile ilgisi de son dönemlerde önemli araştırma konularından biridir. Leishmaniasisli köpeklerde 25-OH-D₃ düzeylerinin araştırıldığı bir çalışmaya, yapılan literatür taramalarında rastlanmamıştır.

2. Leishmania'nın Tarihçesi

Leishmaniasis çok eski tarihlerden beri bilinmektedir. Hastalık visseral leishmaniasis (VL), deri ve mukokutanöz leishmaniasis olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Kala Azar veya Kara Ateş olarak adlandırılan VL Çin ve Bengal'de görülmüş, fakat 3 yıl içinde 750 bin kişinin ölümüne yol açan ilk salgın Hindistan'ın Jessore bölgesinde tanımlanmıştır. Dünya'da ilk kez Hindistan Kalküta'da çalışan Dr Twining tarafından "bataklıklardan çıkan kokulara maruz tropikal memleketlerin endemik kaşeksisi" olarak adlandırılan hastalığın VL ile aynı olduğu 1908 yılında anlaşılmıştır. 1900 yılında William B. Leishman, Hindistan'da Kalküta yakınlarında çalışan Dum-Dum şehrinde dizanteriye yakalanarak İngiltere'ye gönderilen ve 7 ay sonra ölen bir askerin dalak yayma preparatında gördüğü ufak, oval cisimleri *Typanosomaların* yozlaşmış şekilleri olabileceği yönündeki bulgularını 1903 yılında yayınlamıştır. Aynı yıl içinde Sir Charles Donovan yine Hindistan'ın Mdras kentinde hastaların dalağından yaptığı preparatlarda aynı paraziti görmüş ve bunların *Trypanosoma* olmadığını 1903 yılında yayınlarak belirtmiştir.

Parazite ilk olarak “*Piroplazma donovani*” adı verilmiş, daha sonra Dr. Ronald Ross’un “Leishmania” cinsini tanımlamasıyla kala azar etkeni “*Leishmania donovani*” adını almıştır. Günümüzde ise amastigot olarak adlandırılan parazitin memelilerde bulunan formu, bir süre “Leishman Donovan” cisimciği olarak adlandırılmıştır (Unat 1981).

G. C. Chatterjee ve Roggers, Kalkuta’da yaptıkları kültürde, parazitin promastigot şekiller oluşturduğunu görmüşlerdir. Bu bulguyu Roggers 1904 yılında yayınlamıştır. S. R. Christophers 1904 yılında kala-azarın patolojisini tarif etmiş ve parazitin dalak, karaciğer ve kemik iliğinde hemen hemen aynı yoğunlukta olduğunu göstermiştir. Catoire 1904 yılında, Pionese 1905 yılında Akdeniz Bölgesi’nde dalak anemisine yakalanan çocuklarda etkeni bulmuşlardır. Ch. Nicolle, Novy ve W.J. Mac Neal (N.N.N.) ‘in 1904 yılında tarif ettikleri besiyerine benzer bir besiyerinde paraziti üretmiş, köpeklere ve maymunlara aşılama ve Akdeniz alt bölgesinde VL’nin rezervuarının köpek olacağı hipotezini ileri sürmüştür. 1908 yılında Tunus’ta Nicolle ve Compte köpekte leishmania etkenini bulmuşlardır. Bu parazite 1908 yılında Ch. Nicolle tarafından *Leishmania infantum* adı verilmiştir. Ülkemizde ise leishmaniasis ile ilgili ilk bilgiler; Dr. Vefik Vassaf’a göre kala-azarın varlığını yazan ilk doktor Kristamonas’tır. Bu doktor Trabzon’da kala-azar tespit ettiğini açıklamıştır. General Ord. Prof. Dr. Abdülkadir Noyan 1916 yılında dalak ve karaciğer ponksiyonu yaptıkları hastalardan 11’inde *Leishmania donovani* saptamışlardır. Dr. Hafert Kaller 1918 yılında İzmir ve çevresinde kala-azar’a rastladığını bildirmiştir. İbrahim Osman 1931 yılında bir kala-azar vakası yayınlamıştır. Dr. Akil Muhtar Özden 1936 yılında birkaç tane kala azar olgusu yayınlamıştır (Ak ve ark 1995).

3. Leishmania Taksonomisi

Leishmaniasis’in sistematikteki yeri şöyle özetlenebilir (Özcel 1997).

Kingdom: Protista

Subkingdom: Protozoa

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Mastigophora

Class: Zoomastigophora

Order: Kinetoplastida

Family: Trypanosomatidae

Genus: Crithidia, Endotrypanum, Blastocrithidia, Herpetomonas, Leptomonas
Phytomonas

Genus: *Leishmania*

Subgenus: *Leishmania*

Species: *Leishmania donovani*

Leishmania infantum

Leishmania chagasi

Leishmania cropica

Leishmania major

Leishmania aethiopica

Leishmania mexicana (*L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*,

L. pifanoi, *L. enrietti*)

Subgenus: Viannia

Species: *Leishmania braziliensis* kompleksi (*L. braziliensis*, *L. colombiensis*,

L. equatorensis, *L. peruviana*), *Leishmania guyanensis* (*L. guyanensis*, *L.*

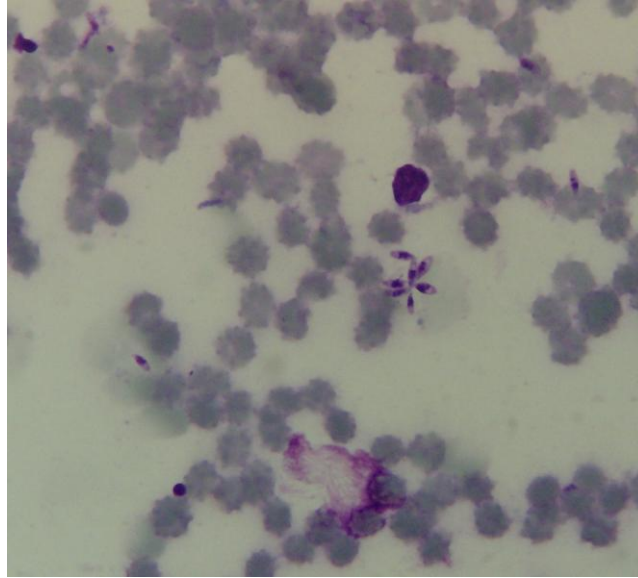
panamensis, *L. shawi*), *Leishmania lainsoni*, *Leishmania naifi*

4. *Leishmania*'nın Morfolojisi

Leishmania cinsine ait olan türlerde memeli konakta görülen “amastigot” ve vektörlerde görülen “promastigot” form olmak üzere morfolojik olarak 2 form görülmektedir. Parazit farklı canlılarda, değişik 2 şekilde bulunur, fakat her iki evrede de birbirine benzer temel yapıda; nükleus yuvarlak ya da oval şekilde, parazitin bulunduğu gruba özgü olan kinetoplast ise nükleuse göre daha koyu boyanmış, yuvarlak, oval veya çubuk şeklinde görülebilmektedir. Her iki form da bölünerek çoğalır ve sırasıyla, nükleus, sitoplazma ve son olarak hücre zarının ayrılmasıyla parazit ikiye bölünür (Özcel ve ark 2007).

4.1. Amastigot

Amastigot formu, 2.5-6.8 μm büyüklüğünde, yuvarlak ya da oval şeklinde olup hareketsiz ve 37 $^{\circ}\text{C}$ 'de uzunlamasına bölünerek çoğalırlar. Sitoplazmada arka uca yakın kısımda büyük bir nükleus ve nükleusa bitişik kinetoplast bulunmaktadır. Sitoplazma içinde ayrıca vakuoller, nokta şeklinde bir bleforablast (kamçı kökü) ve bleforablasttan çıkıp ön kısımda son bulan bir aksonem (kamçının sitoplazmada kalan kısmı) bulunmakta olup kamçı hücre dışına serbest olarak çıkmamaktadır (Özcel ve ark 2007).

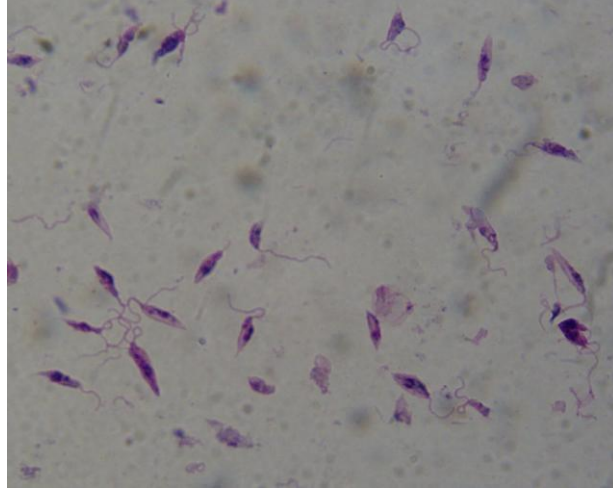


Şekil 1. *Leishmania infantum*'un amastigot formu (Ertuğ S, Ertabaklar H. orijinal).

4.2. Promastigot

Promastigot, 15-20 μm boyunda, 1.5-5 μm genişliğinde mekik şeklinde, kamçılı bir formdur. Vektör olan *Phlebotomus*'ta 27 $^{\circ}\text{C}$ 'de uzunlamasına bölünerek çoğalmaktadır. *Phlebotomus* bağırsaklarında ve amastigot formlarının uygun besiyerlerinde bir süre sonra şekil değiştirmesinden sonra görülen formdur. Ön uçtan çıkan 18-20 μm uzunluğunda serbest bir kamçısı ve aynı zamanda kamçı köküne yerleşmiş olan dokuz çift periferik ve bir çift merkezi liften oluşmuş bir aksonemi bulunmaktadır. Kamçının bağlantı noktasında bir çukurluk olup bu çukurluğa “kamçı paketi” adı verilmektedir. Kinetoplastın ön

kısımında ve kamçının dip kısmında bleforablast, sitoplazma içinde golgi aygıtı ve endoplazmik retikulum bulunmaktadır (Markell ve ark 1999).



Şekil 2. *Leishmania infantum* 'un promastigot formu (Ertuğ S, Ertabaklar H. orijinal)

5. Leishmaniasis'in Yaşam Döngüsü

Phlebotomus, Leishmania türlerinin vektörüdür. Vektör, leishmaniasisli bir omurgalı konaktan kan emerken makrofajlar içinde bulunan paraziti de amastigot formunda almaktadır. Kan emildikten sonra orta midede “peritrofik membran” adı verilen bir membran ile sarılır. Sineğin sindirim enzimleri bu membran içinde salgılanmaktadır. Leishmania'ların bir kısmı, makrofajların lizis olması sırasında sindirilirken diğer kalanların vücudu uzamakta ve kamçı gelişerek enfektif olmayan promastigot haline dönüşüp, bölünerek çoğalmaya başlamaktadır. Bu form “prosiklik” promastigot olarak adlandırılır. Promastigotun vücudu, iki kamçı arasındaki bir yarıkla başlayıp arkaya doğru ilerleyerek her parçada bir çekirdek ve bir kinetoplast kalacak şekilde iki eşit promastigota ayrılır. Bu iki yeni promastigot orijinal promastigotun yarısı kadar büyüklükte olup morfolojik olarak birbiriyle benzerlik gösterir. Morfolojik olarak tek farklılık, birinin kamçısının diğerine göre daha kısa olmasıdır (Özcel ve ark 2007).

6. Leishmaniasis'in Epidemiyolojisi

Leishmaniasisin toplam 88 ülkede endemik olduğu Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından bildirilmektedir. Ayrıca bugün toplam 12 milyon insanın enfekte olduğu, her yıl da 1-1,5 milyon insanın KL'ye, 500.000 insanın da VL'ye yakalandığı ve 350 milyon insanın da risk altında olduğu bildirilmektedir. Leishmaniasiste epidemiyolojik olarak 2 farklı form görülmektedir. Bunlar, zoonotik ve antroponotik formlardır. Akdeniz ülkelerinde yaygın olarak görülen zoonotik formda, dişi *Phlebotomus* köpekleri enfekte eder. Enfekte edilen köpekler, hastalığın esas rezervuarıdır (Desjeux 2001, Schallig ve ark 2002, Molano ve ark 2003).

Doğu Afrika'da Bangladeş'te ve Hindistan'da görülen antroponotik formda ise, hastalık vektör olan *Phlebotomus* ile insandan insana bulaşmaktadır (Gallego 2001). Ayrıca Akdeniz havzası ve Avrupa için de bir sağlık problemi olan bu hastalık, Türkiye'den Portekiz'e kadar olan Avrupa kıyı bölgelerinde görülmektedir. Azerbaycan, Ermenistan, Türkmenistan, Kazakistan gibi ülkelerden de olgular bildirilmiştir. VL'nin bölgesel olarak saptanmış tipleri arasında; Akdeniz, Hindistan, Çin, Sudan ve Güney Amerika tipleri bilinmektedir (Lainson ve Shaw 1987, Desjeux 2001).

Hastalığın rastlandığı ülkeler bölgesel karakter gösterir. Bunda ısı, nem, bölgenin yüksekliği ve bitki örtüsü gibi faktörlere bağlı olarak vektör olan *Phlebotomus* türlerinin o bölgede fazlasıyla çoğalabilmesi ve rezervuar olan insan ve hayvanların bulunması önemli rol oynar. Hastalığın oluşmasında etkili faktörlerden diğerleri ise, beslenme bozuklukları ve vücut direncinin düşük olması olarak gösterilebilir. Hastalığa duyarlılıkta cinsiyet ve ırkın önemi yoktur. Erkeklerde daha fazla görülmesinin nedeni, *Phlebotomus*'ların erkekleri sokma olasılığının daha yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Unat ve ark 1991, Ak ve ark 1995).

Ülkemizde ise VL kıyı bölgelerimizden Ege ve Akdeniz Bölgeleri'nde görülmekle birlikte hemen hemen diğer tüm bölgelerimizden de olgular bildirilmiştir (Ok ve ark 2002, Özbel ve ark 2002). Ülkemizde VL'nin olası vektörlerinin *P. neglectus*, *P. syriacus* ve *P. tobbi* olduğu belirtilmektedir (Ertabaklar ve ark 2001, Ok ve ark 2002, Özbel ve ark 2002, Töz ve ark 2002).

Ülkemizde ve diğer Akdeniz ülkelerinde yapılan çalışmalarda köpeklerde VL'nin oldukça yaygın olduğu (%2-%40) gösterilmiştir (Bettini ve Gradoni 1986). 1993'ten bu yana VL hastalarının bulunduğu bölgelerde sınırlı sayıdaki köpekte yapılan incelemelerde CanL oranının, Manisa ve köylerinde %3,6-%25 arasında, Muğla ili Göktepe köyünde %3,8, Karabük'te %8, Aydın Kuşadası ilçesinde %9,4, İzmir ili ve Karaburun ilçesinde %23, Urla ilçesinde %27 olarak saptandığı bildirilmiştir (Ertabaklar ve ark 2001, Özbel ve ark 2000, Özbel ve ark 2002, Özensoy Töz ve ark 2002).

7. Leishmaniasis'in Tanı Yöntemleri

Leishmaniasis tanısında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

7.1. Direkt Tanı

Nadiren kanda lökositler içinde *Leishmania* amastigotları saptanabilmektedir. Parazit kanda bulunmadığı zaman kemik iliği, dalak, karaciğer, lenf bezi ponksiyonu ile alınan materyal incelenir.

Kan ve kemik iliği yaymasının Giemsa ve Romanovski boyası ile boyandığında amastigotlar saptanabilir. Bu materyal Novy, Nicolle, Mac Neal (NNN) besiyerine ekilerek ya da sincap, hamster veya köpeğe verilerek parazitin üretilmesi ile de tanı konulabilir. Kültürde 10-20 günde, deney hayvanı olarak kullanılan hamsterda haftalar sonra sonuç alınır (Özcel 1995, Töre 1996, Özçelik 1999, Özcel 1997, Saygı 1998, Frederic ve James, 2002).

7.2. İndirekt Tanı

Yüksek duyarlılık ve özgüllükte olan serolojik testlerdir. Bu yöntemlerde amaç akut fazda artan antiparaziter antikorların titrelerini tayin ederek tanıya yardımcı olabilmektir.

7.2.1. ELISA

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi ile elde edilen sonuçların değerlendirilmesinin kullanılacak olan antijenin iyi hazırlanıp hazırlanmadığına bağlı olduğu bildirilmektedir. Promastigot ve amastigotlardan elde edilen eriyik antijenlerden başka son yıllarda daha spesifik olan rekombinant leishmanial antijenler kullanılmaktadır. Son yıllarda hızlı ve pratik olmaları nedeniyle tanıda serolojik testlerin öneminin arttığı bildirilmektedir (Özcel 1995, Töre 1996, Özçelik 1999, Özcel 1997, Saygı 1998, Özensoy ve ark 1998, Rosario ve ark 2005, Costa ve ark 1999, Handemir ve ark 2002).

Dot ELISA yönteminde bu antijenlerle VL şüpheli kişilerde %84 ile %100 oranında antikor cevabı alınmış olup güvenilir bir yöntem olarak kullanılabilceği bildirilmiştir (Özcel 1995, Töre 1996, Özçelik 1999, Özcel 1997, Saygı 1998).

7.2.2. IFA

İmmunolojik tanı teknikleri parazit hastalıklarının tanısında yaklaşık 40 yıl önce kullanılmaya başlanmıştır (Korkmaz ve Ok 2011).

7.2.2.1. Doğrudan Fluoresan Antikor Tekniği (DFAT)

Bu metodun uygulanmasında, bütün özel antikorların işaretli olması gerektiğinden kullanım alanının oldukça sınırlı ve indirekt immunofluoresan tekniğine göre daha az duyarlı olduğu bildirilmektedir (Korkmaz ve Ok 2011).

7.2.2.2. İndirekt Fluoresan Antikor Tekniği (IFAT)

Çalışma prensibi, farklı oranlarda sulandırılmış şüpheli serumların daha önceden lamalar üzerine tespit edilen parazitin kendisinin veya kesitlerinin üzerine konup, inkübasyon ve yıkama işleminden sonra antijen-antikor reaksiyonunun meydana gelip gelmediğine, test edilen serumlar içinde antijene karşı oluşmuş antikorların bulunup bulunmadığının floresan izotiosiyanat ile işaretli spesifik antiantikorlar (anti-globin)

yardımla gösterilmesine dayanmaktadır. Spesifik antikorlar floresan veren bir madde olan floresan izotiosiyanat yardımla görülür hale getirilmektedir. Spesifik olmayan floresan veya yeşil ışığı maskeleyerek için Evans blue gibi karşıt boyama yöntemlerinden yararlanılmaktadır (Korkmaz ve Ok 2011).

Sonuçlar floresan mikroskopunda değerlendirilmektedir. Bu metot ile yüzey antijenleri değerlendirilebildiği gibi, parazit içindeki antijenler de değerlendirilebilmektedir. IFA tekniğinden bütün gruplardaki özel immunoglobulinlerin (IgG, IgM, vb.) ortaya çıkarılması için yararlanılabilmektedir. IFA tekniğinin farklı avantajlarının açıklanması, pratik olarak serolojik tanı konusunda parazit immunolojisinde gelişmelerin olmasını sağlamış ve bu testin birçok uygulama için referans olduğu bildirilmektedir (Korkmaz ve Ok 2011).

7.2.3. Western Blotting

Bu test leishmaniasis tanısında daha çok araştırma amacı ile kullanılır. Testin IFAT ve ELISA'ya göre daha hassas olduğu kabul edilmektedir. 14-16 kDa molekül ağırlığındaki antijenlerin leishmaniasis tanısında önem taşıdığı bildirilmektedir (Marty ve ark 1995).

7.2.4. Direkt Aglütinasyon Testi (DAT)

Hem insanlarda hem de köpeklerde VL tanısında kullanılan bir serolojik yöntemdir. Ayrıca bu test, özel bir konjugeye gereksinim göstermemesi, antijenin uzun süre ve kolayca saklanabilmesi, insan ve bütün hayvanların serumlarıyla çalışma imkanı verebilmesi nedeniyle oldukça ekonomik ve basit bir yöntemdir. Test prensip olarak, serum örneğindeki antikorların promastigotları aglütine etmesi esasına dayanır (Özcel ve ark 2007).

7.2.5. İmmunokromatografik Testler (Hızlı Tanı Testleri)

İmmunokomatografik testler diğerk ismiyle yandan akımlı testler (lateral flow test) olan hızlı tanı testlerinin (HTT) kullanımını diğerk alanlarda olduğu gibi parazitolojide de yaygınlaşmaktadır. rK39 hızlı tanı testi (rK39 dipstick) ile çok kısa sürede güvenilir sonuçlar alınmaktadır (Özcel ve ark 2007).

7.3. Moleküler Biyolojik Yöntemler

Leishmania parazitlerinin tanısı, tiplendirilmesi, serolojik tetkikler için özgül antijenlerin geliştirilmesi ve hastalarda hücreyel immün yanıtın incelenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Töre 1996, Özçelik 1999, Özcel 1997).

7.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Leishmania 'ların tanısında ribozomal RNA (rRNA) gibi hedefler amplifiye edilmiş olmasına rağmen kinetoplast DNA'sı (kDNA), her hücrede birçok kopya içermesi nedeniyle, tercih edilen sekans olduğu bildirilmektedir. PZR yöntemi, özellikle parazit sayısının az olduğu kronik hastalarda deri leishmaniasis tanısında değerli olduğu bildirilmiştir (Weigle ve ark 2002, İkonomopoulos ve ark 2003).

8. Klinik

Köpeklerde deri ve iç organdaki lezyonlara bağıli semptomlar görölmektedir. Özellikle deride görölen lezyonlar tipiktir. Deride görölen başlıca belirtiler hiperkeratoz, kuruma, sertleşme, elastikiyet kaybı, depigmentasyon, kepekli dermatit olarak sıralanabilir. Parazitlerin kıl foliküllerine yerleşmesine bağıli olarak kıllar canlılığını ve parlaklığını kaybeder. Hastalık sırasında tırnaklarda da bazı lezyonlar meydana gelmektedir. Parazitin tırnağın matriksine yerleşir ve orada devamlı büyür. Bu büyümeye bağıli olarak tırnakların normal kullanımını zorlaşmaktadır. Deri lezyonları yanında en sık rastlanan klinik belirtiler, iştahsızlık, buna bağıli olarak kilo kaybı gözlemlenmektedir. Böbrekte nefrit ve glomerulonefritle meydana gelen böbrek yetmezliğine bağıli olarak poliüri, anoreksi, polidipsi, kusma gibi belirtiler gözlemlenmektedir (Baneth ve ark 1997). Genel olarak, hasta köpeklerde kaşeksi, kaslarda zayıflık, uyuşukluk gibi klinik belirtilerin olduğu

belirtilmiştir (Gönül ve ark 2002). Aynı zamanda nötropeni, trombositopeni, üremi, hiperproteinemi, hipergamaglobulin, hiperalbuminemini de klinik olarak hasta hayvanların bulgularında görüldüğü bildirilmektedir (Freitas ve ark 2012).

9. Tedavi

Leishmaniasis tedavisinde birinci ve ikinci derecede seçilen ilaçlar, semptomatik ve destek tedaviler olarak gruplandırılabilir. Tedavide birincil ilaçlarda kullanılan ilk tercih edilen ilaç, beş değerlikli antimon bileşikleridir. Bunun dışında pentamidin, dirençli olgularda alternatif olarak düşünülse de, yüksek toksisitesi nedeniyle pek tercih edilmemektedir (Markell ve ark 1999).

VL'de 1990 yılına kadar antimon bileşiklerine tek alternatif olarak pentamidin gösterilmesine karşın, günümüzde de pentamin dışında, Amfoterisin B, lipid ile birleştirilmiş Amfotericin B (Amfoterisin B kolesterol dispersiyon, Amfotericin B lipid kompleks veya liposomal amfotericin B), Aminosidin, Interferon- γ ve Sodyum stiboglukonat ile immunokemoterapi kombinasyonu ve Miltefosin ile oral kemoterapi seçenekleri bulunmaktadır (Murray 2001).

Ayrıca tüm bu kullanılabilir ilaçların dışında hastanın tedavi sırasında çok iyi beslenmesine özen gösterilmeli, tedaviye ek olarak demir ve vitamin preparatları eklenmesi önerilmektedir. Köpek leishmaniasisin tedavisinde farklı ilaç seçenekleri mevcuttur. Bunlar allopurinol, meglumin antimoniat, amfoterisin, aminoasidin, pentamidin olarak sıralanabilir (Baneth ve Saw 2002).

10. Korunma

Leishmaniasisin hem zoonotik hem de vektör ile insanlara bulaşan bir hastalık olması sebebiyle mücadele yöntemlerini de çok boyutlu olmasını gerektirmektedir. Etkili bir korunma yöntemi için farklı kontrol yöntemleri şöyle sıralanmaktadır (Özcel ve ark 2007).

10.1. Vektör İle İlgili Kontrol Yöntemleri

Phlebotomus'ların beslenme, dinlenme ve üreme ortamlarının farklı olmasından dolayı erişkin ve larvaları ile yapılacak olan mücadeleyi zorlaştırmaktadır. Organik besinlerin çok bulunduğu ve nemli olan her ortamda kolayca üreyebilmekte, erişkinleri gündüzleri karanlık, rüzgar almayan her yerde saklanabilmektedir. Tüm bu özellikler, larva döneminde mücadeleyi oldukça zorlaştırmaktadır. Bu yüzden farklı teknikler deneme gerekliliği ortaya çıkmıştır. Kalıcı insektisitlerle vektör kontrolü, evin etrafında ve içinde meydana gelen bulaşmaları önlemede etkili olabilmekte fakat vahşi doğada kendi içinde olan bulaşmaları önlemek mümkün olmamaktadır. Ayrıca kişiler doğada bireysel korunma yöntemlerini kullanmalıdırlar. Bireysel korunma olarak, *Phlebotomus*'lara karşı kovucu-uzaklaştırıcı losyonlar, ilaç ya da ilaçsız cibinlik kullanılması olarak sıralanabilir. Cibinlik kullanırken dikkat edilmesi gereken husus, deliklerinin vektör kum sineklerinin geçmesine izin vermeyecek büyüklükte olması ve tablet şeklinde satılan ve belli miktar suda eritilen insektisite batırıldıktan sonra kullanılması gerekmektedir. Ayrıca tatarcıkların gece aktif olması nedeniyle gece yatılan yerlerde bir klima veya vantilatör yardımıyla oluşturulan hava akımının faydalı olduğu da kaydedilmiştir (Özcel ve ark 2007).

10.2. Rezervuar İle İlgili Kontrol Yöntemleri

Köpeklerin yılda iki kez serolojik olarak kontrol edilmesi, pozitif bulunan köpeklerin gerekli tedavilerinin yapılması gerekmektedir. Köpeklerin sahiplerine yaz aylarında geceleri köpeklerini kapalı yerde tutmaları ve insektisit emdirilmiş köpek tasmalarını takmaları önerilmektedir. Köpek barınaklarındaki sokak köpeklerini korumak için ise insektisit barınağın etrafındaki tellere uygulanması önerilmektedir (Paşa ve ark 2005, Özcel ve ark 2007).

10.3. Hastalarla İlgili kontrol Yöntemleri

Hastaların doğru ve zamanında tanı alması ve takiben tedavi edilmeleri hem kendi sağlığı açısından, hem de halk sağlığı açısından oldukça önem taşımaktadır. Tedavi

edilmediği sürece öldürücü bir hastalık olması nedeniyle ayırıcı tanıda mutlaka akla gelmelidir.

Endemik bölgelerde sağlık personeli bu konuda eğitilmelidir. Ayrıca broşürler dağıtılarak, basın-yayın organlarında haberler, okullarda, iç yerlerinde konferanslar verilerek halkın da bilgilendirilmesi gerekmektedir (Paşa ve ark 2005, Özcel ve ark 2007).

11. Kalsiyum ve Fosfor Metabolizması

Kalsiyum, kemik yapısının gelişmesi açısından ve mineral yoğunluğunun korunması açısından önemli ve organizmada en fazla bulunan bir elementtir. İskelet sistemi başta olmak üzere yumuşak dokularda hücre içi ve hücre dışı sıvılarda bulunan kalsiyum, biyolojik olayların pek çoğunda anahtar rol oynamaktadır (Kaneko 1989, Kalaycıoğlu ve ark 2000). Kalsiyumun, kas kontraksiyonu, hücre bölünmesi, glikojen metabolizması, kanın pıhtılaşması, enzim aktivitesi, sinirsel uyarım, hormon sekresyonu ve hücre membranlarının geçirgenliği gibi biyolojik mekanizmalarda önemli fizyolojik fonksiyonları vardır. Ayrıca omurgalılarda homeostatisin devamını sağlamaktadır (Pineda 2003).

İskelet sistemi, yapısında esansiyel olarak kalsiyumu içerir, bu yüzden hücre içi ve hücre dışı sıvılara kalsiyum sağlayan ana depo olarak görev almaktadır. Kandaki kalsiyum dengesinin sağlanması için iskelette bulunan toplam kalsiyum deposundan sadece %1 oranında kalsiyum, hücre dışı sıvıya geçmektedir (Kaneko 1989). Kan kalsiyum düzeyinin korunması için hormonal kontrol mekanizmaları bulunmaktadır. Bu mekanizmalar, paratiroid hormon (PTH), kalsitonin ve vitamin D (1,25-dihidroksikolekalsiferol) olmak üzere 3 hormondan oluşmaktadır (Oleszek ve Marston 2000, Fidan ve Dündar 2007). Kemik sürekli olarak birbirine zıt 2 aktivite tarafından yenilenmektedir. Bu aktiviteler (rezorpsiyon ve formasyon) “kemik remodelling unit” diye adlandırılan geçici anatomik yapıda gerçekleşmektedir. Remodellig iskelet homeostazını devam ettirmesi, kemik elastikiyetini sağlaması ve ekstrasellüler kalsiyumun düzenli kaynağını sağlaması açısından önemli rol oynar. Kanda kalsiyum azalınca, kemik dokusu daha fazla kalsiyumu

kana mobilize eder. Bu mekanizma kan kalsiyumunun %7 mg'lık kısmını sabit tutar. Kan kalsiyumunun yaklaşık %3 mg'lık kısmını ise paratiroid bezi kontrol eder (Elçi 2004).

Plazmada kalsiyumun yaklaşık olarak %50 kadarı serbest halde, %40 kadarı proteine bağlı, %10 kadarı ise bikarbonat, laktat, fosfat ve sitrat gibi diffüze olabilen küçük anyonlarla kompleks oluşturmuş halde bulunmaktadır (Kaneko 1989).

Kalsiyum ile yakından ilgili olması sebebiyle birlikte değerlendirilen bir diğer inorganik element fosfordur (P). Ancak inorganik fosfor(Pi), serumda HPO_4^{-2} ve "fosfat" şeklinde bulunur (Ersoy ve Bayşu 1986, Pineda 2003). Ca^{+2} 'nin alışılacelmiş karşıt iyonu olan fosfat, kemikteki hidroksiapatit kristali ve kalsiyum fosfattan oluşur (Murray ve ark 2004).

Vücutta bulunan fosforun yaklaşık %99'u mineralize olmuş kemik matriksinde hidroksi apatit $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ şeklinde bulunurken, %1'i ise yumuşak dokularda intrasellüler olarak bulunur. Fosfatın önemli metabolik fonksiyonları vardır. Bunlar; O_2 'nin hücrelere dağılımı, enerji metabolizması, kas kontraksiyonu ve iskeletal bütünlüğü olarak sıralanabilir (Pineda 2003).

11.1. Mineral ve Kemik Metabolizmasını Düzenleyen Hormonlar

Mineral ve kemik metabolizmasını düzenleyen temel hormonlar; parathormon, kalsitonin ve 1,25-dihidroksivitamin D_3 (veya D_2)'dir (Kalaycıoğlu ve ark 2006).

11.1.1. Paratiroid Hormon (PTH)

Paratiroid hormon (PTH), disülfid bağı içermeyen, 84 amino asitlik tek bir polipeptid zinciri olarak salgılanmakta ve pek çok peptid hormon gibi prehormon olarak sentezlenmektedir. Pro-PTH'ın altı aminoasidin koparılmasıyla PTH oluşur. PTH 1-84 en aktif formudur, fakat bu hormon periferik dokularda 34. aminoasitten kırılır ve amino ucundan ilk 34 aminoasidi içeren parça biyolojik aktivitenin %75-90'ını korur. Karboksil ucundaki 35-84 parçası ise böbreklerden atılır (Montgomery ve ark 2000).

Paratiroid bezlerinde yapılan parathormon (PTH) ekstrasellüler iyonize kalsiyum konsantrasyonunun regülatörüdür. Kemiğin yeniden modellenmesinde önemli rol oynar. Magnezyum, vitamin D ve fosfat, PTH sekresyonunu etkiler. PTH, böbreklerde kalsiyumun, fosfatın ve diğer iyonların tubuler transportunu ayarlar ve 1,25 (OH)₂ D'nin üretimini stimüle eder. 1,25 (OH)₂ D'de Ca⁺² ve PO₄⁻³'in intestinal absorpsiyonunu artırır. PTH distal tubüllerde kalsiyumun reabsorpsiyonunu artırırken, proksimal tubülde fosfatın reabsorpsiyonunu azaltır. PTH, plazma membranında lokalize olan reseptörlerle hormon-reseptör kompleksi oluşturur, etkilerini böyle gösterir (Pineda 2003, Kalaycıoğlu ve ark 2006). PTH, plazma kalsiyum düzeylerini artırdığı için, düşük kalsiyum düzeyi (hipokalsemi) ile sentezi uyarılır, yüksek kalsiyum düzeyi (hiperkalsemi) ile de inhibe olur. Ayrıca 1,25-dihidroksikolekalsiferol, PTH sentezini inhibe eder (Montgomery ve ark 2000).

11.1.2. Kalsitonin

Kalsitonin toplam 32 aminoasitlik tek bir polipeptid zincirinden oluşmuş bir hormondur. Karboksil ucundaki prolin bir amid grubu ile bloke edilmiştir. Biyolojik aktivite için mutlaka gereklidir. Kemiklerde ve böbreklerde kalsitonine duyarlı özel reseptörler vardır (Montgomery ve ark 2000). Kemiklerdeki reseptörlere bağlanan kalsitonin, osteoblast ve osteoklastların kalsiyuma olan geçirgenliğini azaltır ve böylece kalsiyum düzeyininin artmasını önler (Yaman 1999). Tiroid bezinden salgılanan kalsitonin, serum Ca⁺² düzeyleri arttığında ve hiperkalsemi durumunda stimule olurken, serum Ca⁺² düzeyleri azaldığında ve hipokalsemi durumlarında ise redüklenir. Kalsitonin esas olarak kemiklere etki eder, ancak böbrek üzerine de etkisi vardır. Farmakolojik dozlarda kalsitonin, kalsiyum, fosfat, sodyum, potasyum ve magnezyum, renal tubuler reabsorpsiyonunu da azaltarak, serum, kalsiyum ve fosfat konsantrasyonunu düşürür (Kalaycıoğlu ve ark 2006).

Kalsitonin, parathormonun zıt düzenleyicisi olarak etki gösterir. Yani PTH ve kalsitoninin (CT) kemik üzerindeki etkileri antagonistiktir, fakat fosforun renal tubular reabsorpsiyonununun azaltılmasında aynı yönde etki gösterirler. Kalsitoninin etkisi vitamin D'ye bağlı değildir. Osteoklastlar kalsitonin için reseptörlere sahiptirler. Kalsitonin ve

parathormon, ekstrasellüler sıvıda kalsiyum konsantrasyonunu belirli sınırlar içerisinde kalmasını sağlamak için negatif feedback mekanizması ile etki gösterirler (Kalaycıoğlu ve ark 2006).

11.1.3. Vitamin D

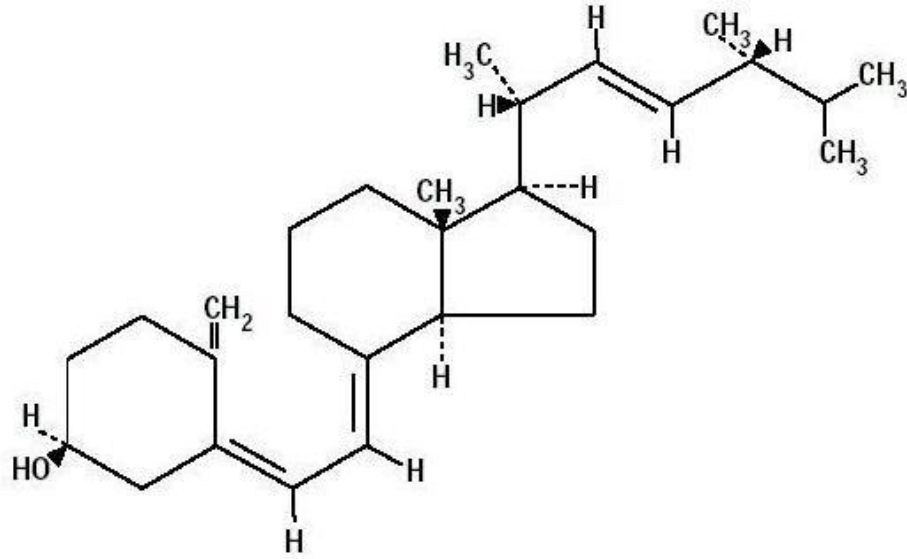
D vitamini, hormon benzeri fonksiyonları olan bir grup steroldür. Yağda ve organik çözücülerde eriyen vitamin D, suda erimez. D vitamininin 2 çeşit formu bulunmaktadır. Bunlar; bazı bitkilerde ve ışına maruz bırakılmış mayalarda bulunan D₂ vitamini veya ergokalsiferol, hayvanlarda ve balık yağında doğal olarak bulunan D₃ vitamini veya kolekalsiferol olarak adlandırılır (Dittmer ve Thompson 2011). Vitamin D₂'nin provitamini ergosterol, vitamin D₃'ün ise 7-dehidrokolesterol'dür. Vitamin D₂ bitki ve mayalarda, vitamin D₃ ise hayvansal dokularda bulunur. Hayvansal dokularda bulunan D₃ kolesterinden, bitkisel olan vitamin D₂ ise ergosterinden sentezlenmektedir (Kalaycıoğlu ve ark 2000). Bu 2 molekül arasındaki fark, ergokalsiferoldeki 22 ile 23. karbonlar arasındaki çift bağ ile ayrılmasıdır. D₂ ve D₃ vitamini inaktiftirler. Bunlar karaciğer ve böbrekte meydana gelen 2 hidroksilasyonla aktive edilirler. Kolekalsiferolün ilk hidroksilasyonu, (25. Karbondan) karaciğerde olur ve kolekalsiferol 25-hidroksilaz enzimi tarafından katalizlenir. 25-OH-D₃ 'ün yarı ömrü yaklaşık 10 gündür. Bu yüzden biyolojik olarak daha aktif olan ancak yarı ömrü 15 saat olan 1,25 dihidroksivitamin D'nin depo formu gibi düşünülebilir (Montgomery ve ark 2000).

D vitamini metabolizmasında esas aktivasyon basamağı böbreklerde yer alır ve 25-hidroksikalsiferol-1 α -hidroksilaz tarafından katalizlenir. Bu hidroksilasyonun sonucunda oluşan 1,25-dihidroksikolekalsiferol (1,25-dihidroksivitamin D), D vitamininin en aktif formudur ve D vitamini bütün etkilerinden sorumludur (Gow ve ark 2011).

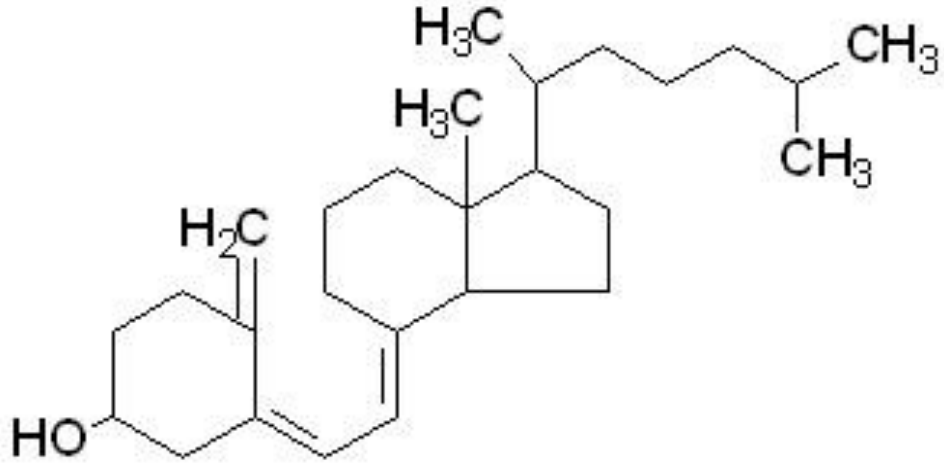
Vitamin D, sadece omurgalı hayvanlar için esansiyeldir. Serum ve vücut sıvılarında kalsiyum ve fosfor miktarının artması, kemik büyümesine ve kemikleşmeye yardımcı olur. D vitamini kalsiyum homeostazında majör rol oynar. Vitamin D'nin aktif

formu; kemik metabolizmasında, kemik yapısında nöral fonksiyonlarda gerekli olan kalsiyum iyonlarının hücre membranından geçmesinde esas görev alır. Vitamin D ayrıca Ca^{+2} 'nin bağırsaklardan emilmesinde kemiklerden mobilizasyonunda aracılık eder (Kalaycıoğlu ve ark 2006).

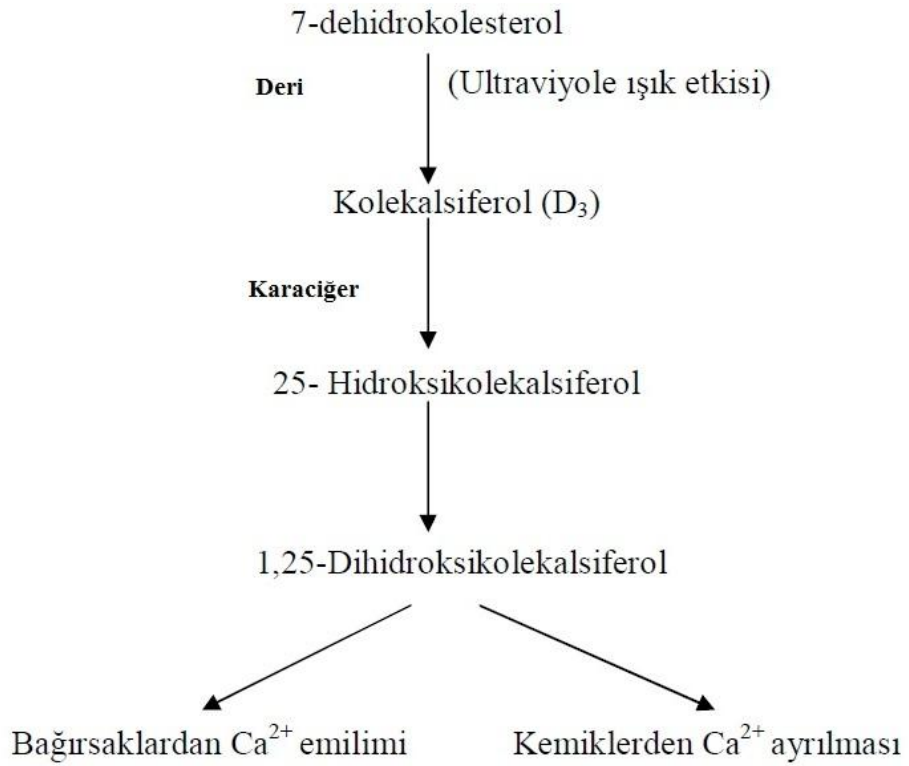
Diyetle alınan vitamin D₂ ve vitamin D₃ şilomikronlarla birleşerek lenfatik sistem ile venöz sirkülasyona taşınmaktadır. Diyetle alınan veya endojen olarak yapılan vitamin D₂ veya vitamin D₃ yağ hücrelerinde depo edilmekte ve gerektiğinde dolaşıma salınmaktadır (Michael 2007).

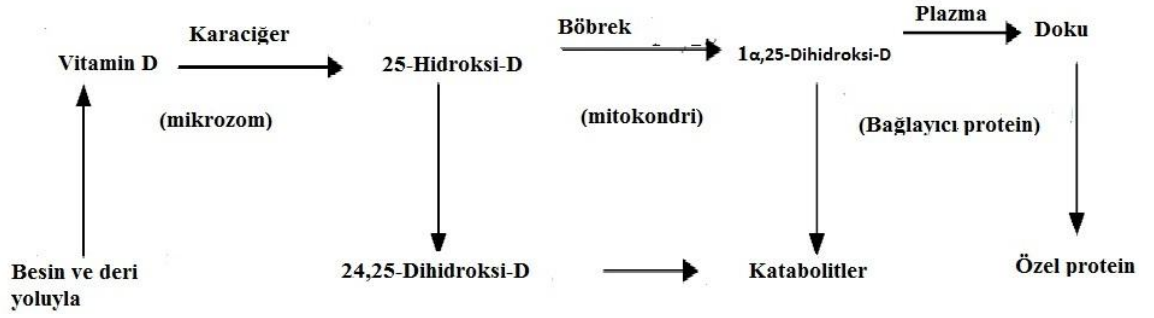


Şekil 3. Ergokalsiferol (Vitamin D₂'nin provitamini)



Şekil 4. Kolekalsiferol (Vitamin D₃'ün provitamini)





Şekil 5. Vitamin D₃'ün metabolizması ve fonksiyonu (Akbel 2005).

12. Osteokalsin

Kemik oluşumunda kimyasal belirteçlerden birisi de “osteokalsin” dir. Osteokalsin; olgun osteoblastlar, odontoblastlar ve hipertrofik kondrositler tarafından sentezlenen toplam 49 aminoasitten oluşan küçük yapıda kalsiyum bağlayıcı matriks bir proteindir, ayrıca kemik metabolizması sürecinin nispi olarak tayininde kullanılan bir kemik belirleyicisidir (Eastell ve ark 2001).

13. Alkalen Fosfataz (ALP)

ALP, alkali ortamlarda fosfo monoesterleri hidroliz edip fosfor açığa çıkararak, kendilerine tekabül eden alkol, fenol veya şekerlere çevrimini kataliz eden bir enzim grubudur. Birçok dokuda bulunan bir enzimdir. Erişkinlerde bulunan alkalen fosfatazın yarısı karaciğerden, yarısı ise kemikten kaynaklanmaktadır (Yıldırım 2001).

ALP'ler ilk defa 1885 yılında Tammem tarafından fark edilmiştir, fakat Suziki, Yoshimura ve Takaishi 1907 yılında ALP'yi tekrar ele alarak daha geniş çapta incelemişlerdir. İlk olarak Robinson, 1923 yılında kemikte kalsifikasyon olayında ALP'nin direk etkisinin olduğu hipotezinin gelişmesini sağlamıştır. ALP, yine ilk olarak 1923 yılında kemik ve böbrekten izole edilmiştir (Yıldırım 2001).

Serumda ALP'nin varlığı ilk kez 1924 yılında gözlemlenmiştir. ALP'nin birden çok değişik formlarda olabileceği kağıt elektroforezinde iki bantın gözlemlenmesiyle 1954

yılında ortaya çıkmıştır. Bu türler en sık karaciğer ve kemik kökenli olan izoenzimlerdir (Yenson 1984).

Alkalen fosfatazlar tabiatta yaygın olarak bulunurlar. İnsan ve hayvan dokularının tamamına yakınında, bitki türlerinin bazılarında, balıklarda, bakteri ve mantarlarda görülmektedir (Uzunoğlu 1998). Alkali ortamda fosfatları hidrolize edebilen bir molekül olduğu için alkalen fosfataz adını almıştır. pH=7'nin üzerinde aktivite göstermektedir. Karaciğer, kemik, bağırsak, böbrek, plasentada bulunan ve kemik dokuda osteoblastlardan salgılanan bir enzimdir (Uzunoğlu 1998, Onat ve ark 2002).

İnsan ve hayvan serumlarındaki alkalen fosfataz, karaciğer, kemik dokusu, böbrek, barsak, plasenta, pankreas, tiroid bezi, diş minesini, lökosit hücre membranı, endoplazmik retikulum, mitokondri, nükleus zarı, hücre membranında görülür (Nillson ve Granström 1987, Uzunoğlu 1998). Kemik yapımındaki artışla beraber ALP seviyesi artar, azaldığında ise düşer. Kemikleşmiş kartilaj zengin fosfataz kaynağı olarak bilinmektedir (Uzunoğlu 1998).

Alkalen fosfatazın metabolik fonksiyonu tam anlaşılacakla beraber, barsak lipid transportunda ve kemiklerde kalsifikasyonda önemli rolü olduğu düşünülmektedir (Murray ve ark 2004, Onat ve ark 2002). Absorptif hücrelerin dış yüzeylerinde bulunur ve transport sürecine yardım eder. Hücre membranının aktif transportunu regüle eden bir enzim olduğu düşünülmektedir (Uzunoğlu 1998).

Alkalen fosfataz aktivitesi kemik hastalıklarında en sık kullanılan biyokimyasal göstergelerden birisidir ve kısmen osteoblastlardan kaynaklanır. En sık kullanılan formasyon markırıdır. Bu nedenle osteoporotik hastalarda serum alkalen fosfataz aktivitesi nadiren normalin iki katını geçmektedir, yani normal seyrinden daha yüksek değerlere çıkmaktadır (Çetiner ve ark 2001, Ecer ve ark 2005).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2. 1. Materyal Toplanması ve Örneklerin Hazırlanması

Bu çalışmaya, Kuşadası ve Bodrum ilçelerinden leishmaniasis şüphesiyle, soğuk zincir kurallarına uygun olarak veteriner hekimler tarafından Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'na gönderilen köpek serumları dahil edildi. Bu serumlar testler çalışılncaya kadar laboratuvarda -20⁰C'de saklandı. IFA testi ile 20 adet *Leishmania* seropozitif ve 20 adet *Leishmania* seronegatif olarak değerlendirilen 4-6 yaşlarında toplam 40 adet erkek köpek serumu biyokimyasal analizlerde kullanıldı.

2.2 Kullanılan Cihazlar

Analizler sırasında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan otomatik pipetler (İso term 20-200 µl, İso term 100-1000µl), UV-spektrofotometre (Schimadzu UV-1601, Japan), santrifüj (nf 800R nüve), Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'nda ELISA okuyucusu (Bio-Tek, ELx800), IFA mikroskobu (Nikon), 37 ⁰C'lik etüv (Memmert), vorteks(Yelowline) ve pipetler (Eppendorf 10-100 µl, Eppendorf 100-1000µl) kullanıldı.

2. 3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Analizler sırasında kimyasal madde olarak SnCl₂.2H₂O (Kalay kloride) (Carlo erba), KH₂PO₄ (Potasyum di-hidrojen fosfat) (Carlo erba), HCl (Hidro klorik asit) (Sigma-adrich), TCAA (Tri kloroasetik asit) (MERCK), NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O (Amonyum molybdat) (Carlo erba), CH₃OH (Metanol) (Sigma-adrich), NaOH (Sodyum hidroksit)

(Carlo erba), Glyoxal-bis-(2-hidroksianil) (MERCK), CaCO₃ (Kalsiyum karbonat) (MERCK), NaCl (MERCK), Na₂HPO₄ (MERCK), KH₂PO₄ (Riedel-de Haëk) kullanıldı.

2.4. IFA

2.4.1. Yöntemin Uygulanması

Lamların Hazırlanması

Laboratuvarda 75 mm uzunluğunda, 25 mm eninde 0,12 mm kalınlığındaki lamların üzerine elmas kalemle her bir sırada altı olmak üzere iki sıra toplam 12 adet yuvarlak çizilerek testin uygulanacağı alanlar belirlendi. Ayrıca lamların sol üst köşelerine elmas kalemle küçük bir işaret konuldu.

Antijen Hazırlanması

Leishmaniasis'li köpeğin lenf nodundan alınan biyopsi materyali steril ortamda NNN besiyerine ekildi. Bu besiyeri, 26 °C'de inkübe edildi. Promastigotların üremesi gerçekleşikten sonra santrifüjlenen besiyeri 4-5 kez PBS ile yıkandı. Promastigotlar mikroskopta 10'luk objektifte yeterli sayıda olacak şekilde daha önceden hazırlanmış IFA lamlarına yayıldı, kurutuldu ve bu lamlar kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS): pH: 7.2

NaCl: 38,25 g

Na₂HPO₄: 3,62 g

KH₂PO₄: 1,05 g

Distile Su: 5,00 lt

Bu maddeler 5 litrelik bir balon içine konuldu ve üzeri 5 litre olacak şekilde distile su ile tamamlandı. Daha sonra pH: 7,2'ye ayarlandı ve bu solüsyon kullanılıncaya kadar buzdolabında +4 °C'de saklandı.

Kaplama Solüsyonu(Gliserin Tampon)

Gliserin tampon, 9 hacim saf gliserin içine bir hacim PBS tampon karıştırılarak hazırlandı. Bu karışım ağzı kapalı şişelerde bir ay saklanabilmektedir.

Fluoresan Konjuge

Bu çalışmada tavşandan elde edilen antiimmunglobulin G konjuge kullanıldı. (Cappel Fluorescein –Conjugated Rabbit IgG Fraction To Dog IgG Whole Molecule, MP Biomedicals Inc., Germany.) Konjugenin optimal sulandırımı kataloglarında belirtilmiş olmasına karşın yeni çalışılan konjugenin, teste başlamadan optimal konsantrasyonları bilinen pozitif ve negatif serumlar kullanılarak belirlendi (1/150).

Pozitif ve negatif kontrol serumları

Önceden çalışılarak negatif ve hangi sulandırmalarda pozitif değerler verdiği bilinen serumlar, kontrol serumu olarak kullanıldı.

Test için gerekli diğer malzemeler

İnkubasyon işlemlerinde yararlanılan 37 °C'lik etüv, nemli ortam için kullanılacak kapaklı küvetler, lamaları yıkama kapları (şale), lam taşıyıcılar, pipetler ve serum titrajlarının yapılacağı sulandırma tüpleri veya plaklardır.

2.4.2. Testin yapılışı

1. Önce sulandırma plaklarının kenarlarına serumların sıra numaraları yazıldı (1,2,3,4 gibi). Bu plakların ilk çukurlarına 150 µl, ikinci çukurlarına 150 µl, üçüncü, dördüncü ve beşinci çukurlarına 50 µl PBS çoklu pipet yardımı ile eklendi.
2. Sulandırım plağının ilk çukurlarına sırasıyla 10 µl köpek serumları eklendi.

3. Serum koyma işlemi bittikten sonra çoklu pipet yardımı ile ilk çukurdaki karışımdan 50 µl ikinci çukura aktarıldı. Bu çukurdaki PBS ile aktarılan sıvı, burada iyice karıştırılıp ikinci çukurdaki karışımdan üçüncü çukurlara 50 µl sıvı aktarıldı. Üçüncü çukurdan alınan 50 µl sıvı, dördüncü çukurlara aktarıldı ve dördüncü çukurdaki sıvı ile iyice karışması sağlandı.
4. Serum sulandırılmaları bitirildikten sonra örnek sayısı için gerekli sayıda uygun antijen kaplı lam, buzdolabından çıkarıldı. Lamlar daha önceden dibine ıslak kurutma kağıdı konulmuş kapaklı küvet içindeki lam tutucuların üzerine yerleştirildi. Lamları yerleştirirken antijen kaplı kısımların üst tarafa gelmesine dikkat edildi.
5. 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 oranlarında sulandırılan örneklerden her biri lam üzerindeki antijenle kaplı çukurlara 10 µl damlatıldı. Sonra kapaklı küvetlerde 37°C 'de 30 dakika etüvde bekletildi.
6. Etüvden çıkan lamlar birbirine yapışmayacak şekilde PBS dolu şalede 3 kez 5'er dakika yıkandı.
7. Lamlar oda ısısında dik olarak kurutma kağıdı üzerine konuldu ve kurumaya bırakıldı.
8. Kuruyan lamlar kapaklı küvetler içindeki sehpanın üzerine antijen üste gelecek şekilde dizildi.
9. Konjuge dilüsyonu her lam için ortalama 150 µl PBS ve 1 µl konjuge olarak hazırlandı. Hazırlanan konjuge sulandırımından her çukura yaklaşık 15-20 µl konuldu.
10. Konjuge damlatılmış lamlar küvetin kapağı kapatılarak (küvetin dibindeki kağıdın ıslak olmasına özen gösterilerek) 37°C'lik etüve yerleştirildi ve 30 dakika bekletildi.
11. Etüvden çıkarılan lamlar 3 kez 5 dakika PBS'li şalede yıkandı.
12. Lamların üzerine kurumadan gliserin-PBS karışımından 2-3 damla damlatılıp lamelle üzeri kapatıldı.
13. Lamlar floresan mikroskopta 490 nm dalga boyundaki eksitasyon filtresi ile 20'lik oküler kullanılarak incelendi.

2.4.3. Sonuçların Yorumlanması ve Değerlendirilmesi

Çalışmada 1/64 ve üzeri titreler pozitif olarak değerlendirildi.

2. 5. Yöntemler

2.5.1. Kan Serumunda Kalsiyum Miktarının Glyoxal-bis Metoduyla Tayini

Glyoxal-bis yüksek pH'da kırmızı renk verdiği için Ca tayininde tercih edildi. Diğer +2 değerlikli katyonların varlığında Glyoxal-bis'in kalsiyumu şelatlayıcı özelliği kullanılarak ölçülmesi esasına dayanan metotla gerçekleştirildi (Bellinger ve Campbell 1965).

Ayırıcılar

1. Metanol

2. Glyoxal-bis-(2-hidroksyanil): 100 mg Glyoxal-bis (2-hidroksyanil) 100 ml metanolde eritildi. Kahverengi şişede saklandı.

3. 2 N Sodyum hidroksit (NaOH)

Yapılışı

10x75 mm boyutlarında test ve blank işaretli iki adet tüp alındı. Test yazılı tüpe 10µl serum, blank tüpüne ise 10µl distile su konuldu. Bundan sonra her iki tüpe 500'er µl distile su ve 500'er µl Glyoxal-bis konup, karıştırıldı ve 30 sn çalkalandı. Takiben 15 dakika beklendi. Bekleme süresinin sonunda her iki tüpe de 50'şer µl 2N NaOH ilave edildi ve 30 sn çalkalandı. Çalkalama işleminin sonunda 15 dakika daha beklendi ve distile suya karşı 546 nm'de absorbanslar okundu.

Hesaplamalar

(Testin Absorbansı-Körün Absorbansı) x 26 = mg Ca/100 ml serum

2.5.2. İnorganik Serum Fosfatın Kalay Klorid Kullanarak Belirlenmesi

Biyolojik materyallerde fosfatın belirlenmesinde Kalay Klorid indirgeyici ajan olarak kullanıldı. Asidik ortamda fosfat iyonlarıyla amonyum molibdat reaksiyona girdi ve amonyum molibdifosfat oluştu. Bu oluşan ürünün kalay kloride ile reaksiyona girmesiyle meydana gelen mavi rengin 660 nm'de spektrofotometrede ölçülmesi esasına dayanan metotla gerçekleşti (Horwitt 1952, Davies ve ark 1973).

Ayırıcılar

Solüsyon A: % 10 triklorasetik asit

Solüsyon B: %1 amonyum molibdat

Solüsyon C: 10 ml HCl içinde 3 g kalay klorid

Solüsyon D: 100 ml distile su içinde 0,2 ml solüsyon C

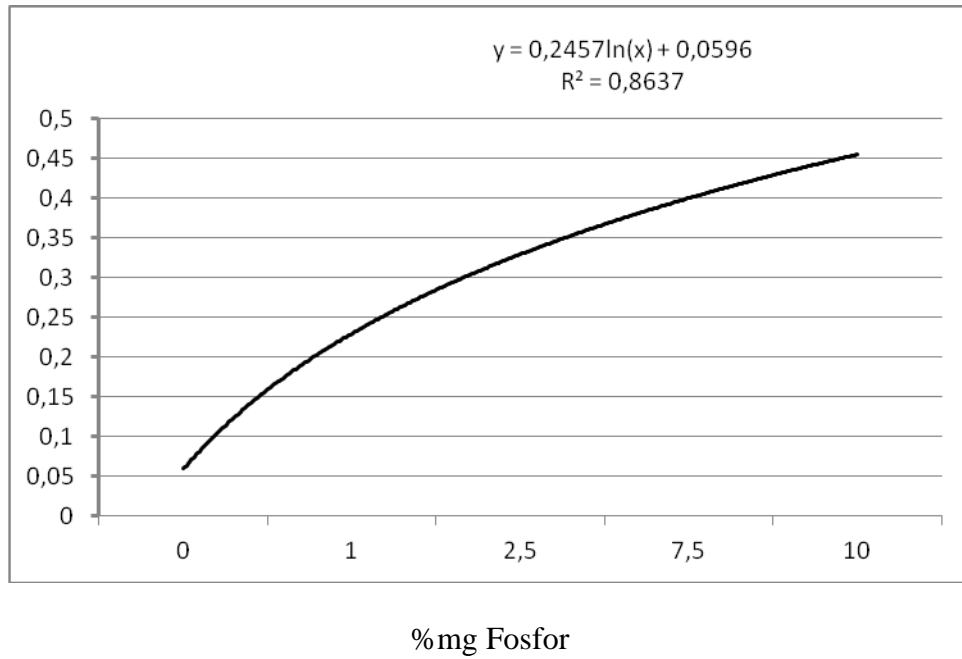
Solüsyon E: %15 trikloroasetik asit

Yapılışı

Proteinsiz süzöntü hazırlamak için 0,4 ml seruma 3,5 ml su eklendi. Daha sonra %15'lik trikloroasetikasitten 1 ml karışıma eklendi, karıştırıldı. Sonra karışım 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatanttan 0,5 ml alındı, üzerine 5 ml solüsyon A eklendi ve karıştırıldı. Karışıma solüsyon B'den 0,5 ml eklendi, karıştırılıp 7 dakika beklendi. Daha sonra solüsyon D'den 0,5 ml eklendi ve karıştırıldı. 15 dakika sonra 660 nm'de spektrofotometrede okutuldu.

Fosfor Stok Standardı; 0,4394 mg saf susuz KH_2PO_4 'ü distile suda çözüldü ve 100ml'ye dilüe edildi.

Fosfor Çalışma Standardı; 5 adet cam tüpe sırasıyla 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 ve 10.0 ml hazırladığımız stok standardından koyuldu ve 100 ml'ye tamamlandı. Sonra 5 ml solüsyon A eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra solüsyon B'den 0,5 ml eklendi, karıştırıldı ve 7 dakika beklendi. Son olarak solüsyon D'den 0,5 ml eklendi ve karıştırıldı. 15 dakika sonra spektrofotometrede 660 nm'de okutuldu.



Şekil 6. P standart eğrisi

2.5.3. 25-Hidroksi Vitamin D Tayini

Köpek serumlarında 25-OH-D₃ seviyesi ticari bir kit (25-Hydroxy Vitamin D EIA, Immunodiagnostic Systems Ltd., Boldon, UK) ile ölçüldü. Serum veya plazmada 25-OH-D₃ ve diğer hidroksillenmiş metabolitleri arama esasına dayanan bir metottur. Koyun 25-

OH-D₃ antikorları ile kaplı kuyucuklara önce serumlar eklenir, sonra horse radish peroksidaz ile işaretli avidin eklenir ve substrat eklenerek renk oluşması sağlandı. Optik okuyucuda okutulur.

Ayıracılar

Kontroller(CTRL): Kontroller (CTRL) 25-OH-D₃ ve <1% sodyum azid içerir.

25-D Biotin Solüsyonu(25-D BİYOTİN)(SOLN): 25-D Biotin konsantrasyonu (25-D BİYOTİN)(50X) 25-hidroksivitamin D₃ ve biotin içerir.

Yıkama Solüsyonu (WASHBUF) (SOLN): 50 ml olan wash buffer solüsyonuna (sarı büyük kapaklı) 950 ml distile su eklendi.

Yapılışı

1. 6 tane kalibratör, 1 tane kontrol ve serum örneklerinden cam tüplere 25'er µl ilave edildi.

2. Daha sonra her cam tüpe 1 ml 25-D Biotin eklendi, vorteksle 10 saniye karıştırıldı.

3. Cam tüplerden microplate'lere 200'er µl kalibratör, kontrol ve serumlardan koyuldu. Yapıştırıcı jelatin ile microplate'in üstü kapatılıp 2 saat oda sıcaklığında (25°C) bekletildi.

4. Yıkama solüsyonu ile 3 kez 250 µl yıkama solüsyonu ekleyerek yıkama işlemi gerçekleştirildi.

5. Multipipetle 200'er µl tüm kuyucuklara enzim-konjugat ilave edildi. Microplate'in ağzını jelatinle kapatılarak oda ısısında (25°C) 30 dakika bekletildi.

6. Yıkama solüsyonu ile 3 kez tekrar yıkandı.

7. Multipipetle 200'er µl substrat ilave edildi. Microplate'lerin ağzını tekrar jelatinle kapatıp oda ısısında (25°C) bekletildi.

8. Multipipetle 100'er µl stop solüsyonu ilave edildi.

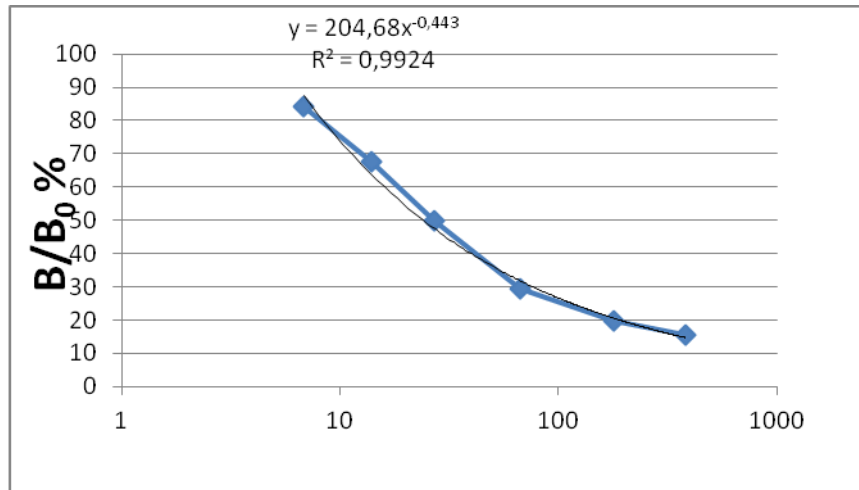
9. 10 dakika içerisinde 450 nm'de microplate'i elisa okuyucuda okutuldu.

Hesaplamalar

Her bir kalibratör, kontrol ve bilinmeyen örneğin bağlanma yüzdeleri aşağıdaki gibi hesaplandı:

$$B/B_0 \% = \text{absorbans} \times 100$$

Semilogaritmik grafik kağıdına kalibrasyon eğrisi çizerek, $B/B_0\%$ 'e karşı ordinat üzerine 25-hidroksivitamin D'nin konsantrasyonu yazılarak grafik hazırlandı. Her bilinmeyen örnek için $B/B_0\%$ oranı hesaplandı ve eğrinin formülünden nmol/L olarak 25-OH-D₃ değerleri bulundu.



25-OH-D₃ nmol/L

Şekil 7: 25-OH-D₃ Kalibrasyon Eğrisi

2.5.4. Alkalen Fosfataz'ın (ALP) Kantitatif Tayini

Köpek serumlarında alkalen fosfataz seviyesi ticari bir kit (Quantitative Determination of Alkaline Phosphatase (ALP) IVD, Spinreact®, İspanya) ile ölçüldü.

ALP, p-nitrophenol fosfatın hidrolizlenmesini katalizler. Böylece P-nitrophenol ve açığa çıkan fosfatın kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanan bir metottür.

Ayırıcılar

1-R1 Tampon: Dietanolamin pH 10,4 1mmol/L

2-R2 Substrat: p-Nitrofenilfosfat 10mmol/L

3-Working Reagent: (WR) 15 ml R1 Buffer içerisine 1 tablet R2 atıldı ve çözüldü.

Kullanıncaya kadar 2-8⁰C'de bekletildi.

Yapılışı

1. Küvet içine 1,2 ml WR solüsyonu ve 20µl örneklerimizden konuldu, 1 dakika karıştırıldı.

2. 405 nm'de initial absorbansı okutuldu ve 3 dakika boyunca her dakikada absorbansı tekrar okutuldu.

3. Absorbanslar arasındaki değerler hesaplandı ve dakikadaki ortalama absorbans değerleri hesaplandı.

Hesaplamalar

$$\Delta A/\text{min} \times 3300 = \text{U/L de ALP}$$

2.5.5. İstatistiksel Analizler

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi amacıyla SPSS (for Windows Release 11.5 Standart Version Copyright © Spss Inc. 1989-2001) hazır paket programı kullanıldı. Bağımsız örnekleme testi (independent sample t test) kullanılarak önem analizleri yapıldı.

3. BULGULAR

3.1. *Leishmania* IFA Test Sonuçları

IFA testi ile çalışılarak *Leishmania* seropozitif saptanan 20 köpek serumunun IFA test titre sonuçları tablo 3’de gösterilmiştir.

Çizelge 1: *Leishmania* Seropozitif 20 Köpeğin IFA Test Sonuçları

	Serum Sayısı	Titreler
	1	1/64
	3	1/128
	4	1/256
	12	1/512
Toplam	20	

3.2. *Leishmaniasis*li Köpek Serumlarındaki Biyokimyasal Analiz Sonuçları

Çalışma kapsamındaki 20 *Leishmania* seropozitif ve 20 *Leishmania* seronegatif erkek köpeğin serum 25-OH-D₃, ALP, Ca ve P sonuçları ise tablo 2 ve şekil 8’de verilmiştir.

Çizelge 2: *Leishmania* Seropozitif ve Seronegatif Köpeklerin 25-OH-D₃, ALP, Ca ve P Sonuçları

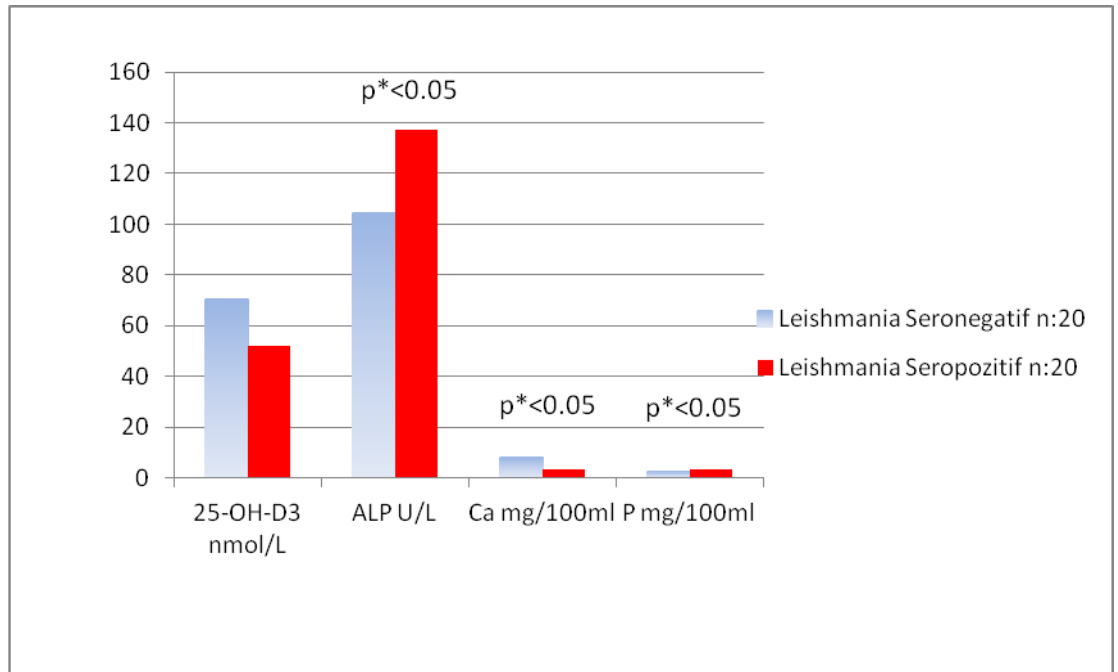
	<i>Leishmania</i> seronegatif (n:20)	<i>Leishmania</i> seropozitif (n:20)	p
25-OH-D ₃ nmol/L	70,01±14,12	51,89±6,59	0,252
ALP U/L	104,5±8,7	137,1±11	0,026*
Ca mg/100ml	8±0,5	3,38±0,48	0,000*
P mg/100ml	2,19±0,17	3,01±0,11	0,000*

Leishmaniasisli ve kontrol grubu köpeklerin serum 25-OH-D₃ seviyeleri (ortalama) sırasıyla 51,89 nmol/L ve 70,01 nmol/L olarak tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0,05).

Leishmania seropozitif köpeklerin serum ALP değerleri 137,1 U/L iken seronegatif köpeklerin 104,5 U/L olarak bulunmuştur. İstatistiksel olarak iki grup arasında anlamlı bir fark olduğu görülmektedir (p<0,05).

Leishmania ile enfekte olan köpeklerde serum Ca seviyeleri 3,38 mg/100 ml, kontrol grubu köpeklerde 8 mg/100 ml olarak tayin edilmiştir. İstatistiksel olarak iki grup arasında anlamlı bir fark olduğu görülmektedir (p<0,05).

Leishmaniasisli ve kontrol grubu köpeklerin serum P seviyeleri (ortalama) arasındaki fark ise sırasıyla 3,01 mg/100 ml ve 2,19 mg/100 ml olarak bulunmuştur. İstatistiksel olarak iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (p<0,05).



Şekil 8. Serumların 25-OH-D₃, ALP, Ca, P Düzeyleri

4. TARTIŞMA

Kanin leishmaniasis, *L. infantum* ve *L. chagasi*'nin sebep olduğu özellikle Akdeniz ülkelerinde başta olmak üzere, Afrika, Asya ve Amerika'da görülen endemik bir hastalıktır (Bettini ve Gradoni 1986). Bu protozoal hastalık genellikle kronik seyirlidir ancak insan, köpek ve rodentlerde ölümcül olabilir (Özbel ve ark 2000). Köpekler, insanlar için hastalığın önemli rezervuarıdır (Desjeux 1991, Kirmse ve ark 1987). Ayrıca ara konakçıları *Phlebotomus* ve *Lutzomyia* cinslerine bağlı sineklerdir (Encinas Grandes ve ark 1988, Gothe 1991, Nunes ve ark 1988). Kanin visseral leishmaniasisli köpeklerde deri lezyonu, kilo kaybı, lokal ve genel lenf bezleri hastalığı, göz lezyonları, kronik ishal, böbrek ve karaciğerlerde bozukluk, burun kanaması ve topallama gibi çeşitli semptomlara sebep olur (Ciaramella ve ark 1997).

Bu çalışma leishmaniasisli köpeklerde kemik metabolizmasının belirteçlerinden kalsiyum, fosfat, alkalen fosfataz ve 25-OH-D₃ değerlerinin sağlıklı köpeklere göre nasıl değiştiğini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Literatür taramalarında leishmaniasisli köpeklerde Vitamin D düzeylerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Köpeklerde leishmaniasis tanısında birçok farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler: sito-histolojik metotlar, serolojik testler, parazitolojik metotlar (ksenodiagnosis, kültür), moleküler metotlar, hücrel immun yanıtın belirlenmesi olarak sıralanabilir. IFAT yönteminin duyarlılık ve seçiciliğinin %100'e yakın olduğu bildirilmiştir ve Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (WOAH) tarafından referans serolojik yöntem olarak kabul edilmektedir (Mettler ve ark 2005).

Coşkun ve ark (1997), Türkiye'nin Batısı'nda köpeklerde *L. infantum* enfeksiyonunun seroprevalansını araştırmışlardır. Bu çalışma için toplam 182 köpek IFAT yöntemi kullanılarak anti-*Leishmania infantum* antikorları açısından değerlendirilmiştir. Araştırmaya dahil edilen 182 köpeğin 10'unda (%5,5) antikor titresi $\geq 1/128$ olarak saptanmıştır. Diğer 172 köpek ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Enfeksiyon oranı Bursa'da %4,3 iken Muğla'da %33,3 olarak tespit edilmiş, Antalya ve İstanbul'da seropozitif köpeğe rastlanılmamıştır. Seropozitif olarak değerlendirilen toplam 10 köpektan 5'inde hiçbir semptom görülmemiştir. Antikor titresi 1/4096 olan bir köpekte

CanVL'nin belirgin semptomlarının çoğu saptanmıştır. Diğer 4 köpekte hastalığın orta şiddette veya daha az belirgin olan belirtileri saptanmıştır. Seropozitif köpeklerin yaşları 9 ay ile 4 yıl arasında değişmiştir. Köpeklerin cinsiyeti ile enfeksiyon arasında ilişki önemsiz bulunmuştur.

Serolojik testlerle ilgili yapılan bir diğer çalışmada ise, araştırmacılar (Kamburgil ve Dik 1998), köpeklerde VL'nin IFAT ile tespitini gerçekleştirmişlerdir. Bu amaçla yaşları 2,5 ay ile 11 yaş arası değişen toplam 278 köpekten 10'ar ml kan alınmıştır. Serolojik testler uygulanmıştır. IFAT'ta sonuçlar referans pozitif ve negatif serumlarla karşılaştırılıp literatürlerde de belirtildiği gibi 1/40 ve daha yukarı titreler pozitif olarak değerlendirilmiştir. IFAT'ta sensitivite ve spesifitenin %100'e yakın olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan diğer bir çalışmada Silva ve ark (2012), VL'nin tanısında serolojik testlerin değerlendirilmesini araştırmışlardır. Bu çalışmada ELISA, IFAT ve immunokromatografik testler Can VL'nin tanısında karşılaştırılmıştır. Yöresel alandan VL'li 144 köpekten serum elde edilmiştir. Sırasıyla serolojik testlerden ELISA-*L.major-like*, ELISA-*L.chagasi*, IFAT-*L.major-like*, IFAT-*L.chagasi* ve immunokromatografik testlerin duyarlılığı sırasıyla %93, %100, %73, %60, %93; spesiflikleri ise sırasıyla %87, %92, %77, %96 ve %92 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre ELISA-*L.chagasi* canin visseral leishmaniasis'in tanısında en kullanışlı yöntem olduğu saptanmıştır, bunun yanında özellikle özel donanımlı laboratuvarların ihtiyaç duyulmadığı zamanlarda immunokromatografik testinde alternatif olarak kullanılabilceği saptanmıştır.

Doğal yollardan *L. chagasi* ile enfekte olmuş köpeklerde hematolojik ve biyokimyasal parametreleri değerlendirmek amacıyla yapılan bir çalışmada her iki cinste değişik ağırlıklarda ve yaşta 85 yetişkin köpek kullanılmıştır. İmmunofluoresans testinde (IFAT) titresi 1/40 ve üstünde değerleri pozitif olarak almışlardır. Hasta köpeklerde kaşeksi (%77,9), keratit (%61,8), lenfopeni (%55,9) en sık görülen klinik belirtilerdir. Kırmızı kan hücreleri (%63), hematokrit (%72), hemoglobin (%62), lökosit (%33) düzeylerinin enfekte köpeklerin hematolojik muayenesinde azaldığı görülmüş, yine nötropeni (%28), trombositopeni (%50) üremi (%45), hiperproteinemi (%53),

hipergamaglobulin (%62), hiperalbuminemi (%58) klinik olarak hasta hayvanların laboratuvar bulgularında görülen değişikliklerdir (Freitas ve ark 2012).

Gönül ve ark (2002), yaptıkları araştırmada bir köpekte immunolojik ve histolojik olarak teşhis ettikleri leishmaniasisin klinik ve laboratuvar bulgularını karşılaştırmışlardır. Araştırmacıların leishmaniasisli köpekler için bildirdiği kaşeksi, iştahsızlık, hareket etmede isteksizlik, keratokonjunktivit, kaslarda zayıflık, uyuşukluk, hepatomegali ve lenfadenopati gibi klinik belirtilerin bu vakada da mevcut olduğunu saptamışlardır. Klinik ve fiziksel muayenesinde VL ön tanısı ile etken izolasyonuna gidilen köpekten alınan kan örneğinin IFAT ile yapılan serolojik kan testinde *L.infantum* 'a karşı spesifik IgG antikor pozitifliği 1/1024 titrasyonunda pozitif bulunarak hastalık doğrulanmıştır. Ayrıca araştırmacılar serolojik testler ile hastalığın kesin teşhisinin konulabileceğini iddia etmişlerdir. Bu nedenle IFAT hastalığın teşhisinde oldukça duyarlı ve spesifik bir test olup, pozitif hastalarda 1/40 ile 1/1024 arasında titrasyonların diagnostik olduğu bildirilmiştir. Yapılan araştırmada, yukarıda ayrıntılı olarak sunulan çalışmalarda olduğu gibi, Araştırmacıların (Kamburgil ve Dik 1998, Freitas ve ark 2012, Gönül ve ark 2002) klinik bulgular ve laboratuvar testleri ile karşılaştırmaları sonucu köpeklerde leishmaniasis tanısı için yeterli kabul ettikleri 1/40 ve üzeri titreler bu çalışmada da pozitif olarak kabul edilmiştir.

Kemik yoğunluğu ile Ca, P, ALP ve 25-OH-D₃ arasındaki ilişki bilinmektedir. Vitamin D'nin kalsiyum ve fosfor homeostasisi ile yakından ilgili olduğu, kemik oluşumunda, kemik model değişiminde önemli rol oynadığı yapılan araştırmalarda gösterilmiştir. Vitamin D eksikliği, çevresel ve genetik faktörlerden dolayı olabilir. Vitamin D eksikliği sonucu raşitizm, kemik yumuşaması, ikincil olarak ta hipokalsemi ve hipofosfatemi görülebilir. Vitamin D'nin uzun yıllardır insanlarda ve evcil hayvanlarda raşitizm ve kemik yumuşamasını önlemesinin bilinmesine rağmen, son araştırmalar, sağlıklı iskelet bakımının ötesinde, bağışıklık sistemini güçlendirici ve kansere karşı koruyuculuk gibi önemli rolleri de olduğunu göstermiştir (Dittmer ve Thompson 2011).

Köpeklerde vitamin D metabolizması genellikle böbrek yetmezliği ile ilgili patolojik durumlarda araştırılmıştır. *Leishmania* ile enfekte köpeklerde D vitamini metabolitlerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Hasta köpeklerin laboratuvar

bulgularında ALP, Ca ve P düzeylerinde görülen değişimler leishmaniasisin kemik metabolizması üzerine bir etkisinin olabileceği hipotezine dayanarak, bu çalışmada serum 25-OH-D₃ düzeyleri tayin edilmiştir. Galler ve ark (2011), kronik böbrek yetmezliği olan 19 köpeğin kanındaki vitamin seviyesini araştırmışlar ve kontrol grubu olarak yaş, cinsiyet ve kiloları bakımından benzer olan sağlıklı köpeklerle karşılaştırma yapmışlardır. 25-OH-D₃ değerlerini HPLC yöntemiyle ölçmüşlerdir. Sonuçları incelediklerinde, sağlıklı köpeklerle 25-OH-D₃ değerlerini 37,6 µg/L, kronik böbrek yetmezliği olan köpeklerde ise 14,5 µg/L olarak saptamışlardır. Kronik böbrek yetmezliği olan köpeklerde 25-OH-D₃ düzeylerindeki düşüşü iştahsızlık ve kusmaya bağlı diyetle alınan Vit D'den yararlanılamamasına bağlamışlardır. Yapılan çalışmada *Leishmania* titrasyonu negatif köpeklerde 25-OH-D₃ düzeyleri ort. 70,01 nmol/L (28 µg/L), 1/40'ın üzerindeki pozitif köpeklerde ise 51,89 nmol/L (20,7 µg/L) olarak ölçülmüştür. Araştırma sonunda kontrol grubunda elde edilen değerler, Galler ve ark(2011)'nin sağlıklı köpekler için buldukları değerlere yakındır. Ancak Araştırmacılar 25-OH-D₃ ölçümlerini HPLC'de yapmışlardır; mevcut araştırmada ise ELISA yöntemine dayalı metot ile analizler yapılmıştır. Kullanılan yöntemlerin farklı olmasından dolayı sonuçlar arasında fark olabileceği düşünülebilir.

Cortadellas ve ark(2010), yaptıkları çalışmada farklı evrelerde kronik böbrek hastalığı olan köpeklerde kalsiyum ve fosfor dengesini araştırmışlardır. Kronik böbrek hastalığı olan köpeklerde kalsiyum-fosfor dengesi negatif etkilenmiştir. Yaşları 1 ile 16 arasında değişen 23 erkek, 31 dişiden oluşan, 22 sağlıklı köpek ve 34 kronik böbrek hastalığı olan köpek çalışmaya dahil edilmiştir. Serum parathormon (PTH) ve serum fosfor konsantrasyonları genel olarak kronik böbrek hastalığı olan köpeklerde artış göstermiştir, Kronik böbrek yetmezliği olan köpeklerin %68,5'inde hiperfosfatemisi, % 75,9'unda yüksek parathormon seviyesi görülmüştür. İstatistiksel analizler, serumdaki fosfor konsantrasyonu ve PTH konsantrasyonu arasında anlamlı pozitif korelasyon göstermiştir. Kalsitriol konsantrasyonu kronik böbrek hastalığı olan köpeklerin 47 tanesinde giderek azalma göstermiştir. Buna karşılık kontrol grubu ile kronik böbrek yetmezliği hastalığı olan köpekler arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir.

Osteoporozda hipokalsemi, hipofosfatemisi ve ALP aktivitesindeki artış karakteristiktir. Sahota ve ark(2004)'nin yaptığı bir çalışmada osteoporoz teşhisi konulmuş menapozlu kadınlarda kalsiyum dengesi, kemik turnoveri, kemik mineral yoğunluğu

değerlendirilmiş ve buna paralel olarak vitamin D ile paratiroid hormon arasındaki ilişki araştırmışlardır. 60 yaş üstü ve menapozlu, kemik erimesi görülen 421 kadın 24 ay boyunca gözlem altına alınmıştır. Çalışma, hipovitaminosis D, ikincil hiperparatiroidizm ve kontrol grubu olarak 3 gruba ayrılmıştır. Serum 25-(OH)-D₃ düzeyi 30 nmol/L'nin altında olanlar hipovitaminoz grubu olarak belirlenmiştir. Serum 25-OH-D₃ ve PTH arasında negatif korelasyon tespit edilmiş, hipovitaminosis D grubunda serum 1,25 (OH)₂D₃, 25-OH-D₃ seviyesi düşük, kemik ALP düzeyleri yüksek bulunurken; Ca, Mg, P, kreatinin düzeylerinde önemli bir farklılık görülmemiştir.

Gow ve ark (2011), yaptıkları çalışmada iltihaplı bağırsak hastalığı olan köpeklerin vitamin D ve plazmadaki paratiroid hormon konsantrasyonlarını sağlıklı köpeklerle kıyaslamışlardır. 36 tane sağlıklı köpekte, 49 tane hasta köpekte 25-OH-D₃ ve 1,25 dihidroksivitamin D konsantrasyonları ölçülmüştür. Aynı zamanda bu köpeklerin plazma paratiroid hormon ve kalsiyum konsantrasyonu değerleri ölçülmüştür. Ölçüm sonuçlarına göre, iltihaplı bağırsak hastalığı olan hipoalbuminemi olan köpeklerde 25-OH-D₃ değerleri, sağlıklı köpeklere göre daha düşük, paratiroid hormon konsantrasyonu yüksek, iyonize kalsiyum konsantrasyonu düşük olarak saptanmıştır..

Tryfonidou ve ark (2003), büyüme hormonunun vitamin D₃ metabolizmasına, kalsiyum dengesine etkilerini ve büyümekte olan köpeklerde iskelet sistemine spesifik etkilerini araştırmışlardır. Yaşları 3-6 haftalık olan, toplam 7 dişi ve 7 erkek kaniş cinsi köpek yavrusu çalışmaya katılmıştır. Bunlardan 6 tane kanişe belli dozda büyüme hormonu (GH) verilmiştir. Çalışma için 8 tane kontrol grubu belirlenmiştir. GH verilen kaniş grubu, kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. GH verilen kanişlerin, plazma insulin-like büyüme faktörü (IGF-I) konsantrasyonu ve 1,25 dihidroksikolekalsiferol düzeylerinin arttığı, 24,25 dihidroksikolekalsiferol seviyelerinin ise azaldığı görülmüştür. Plazma kalsiyum, fosfat ve PTH konsantrasyonları, kontrol grubuyla kıyaslandığında ikisinin arasında bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. Plazma ALP konsantrasyonu, GH verilen kanişlerde anlamlı olarak artmıştır. GH'in barsaktan Ca ve P emilimini etkilemeksizin gen ekspresyonu düzeyinde 1,25(OH)₂D₃ sentezini artırdığı ileri sürmüştür.

Driel ve ark(2006), $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ 'in otokrin/ parakrin fonksiyonunu araştırmak amacıyla bir çalışma yapmışlardır. 1α -hidroksilazın, insan osteoblastlarında eksprese edildiğini, aynı zamanda vitamin D'ye bağlanan megalin ve kubilin protein reseptörlerinin bulunduğunu saptamışlardır. Osteoblast hücre kültürlerine substrat olarak 25-OH-D_3 ilavesi ile osteoblastların $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ ürettikleri, ALP ve osteokalsin ekspresyonunun hafif arttığı, Ca ve paratiroid hormon düzenlenmesine etkisinin olmadığı görülmüştür.

Serumdaki 25-OH-D_3 ile kemik turnover markeri, kemik mineral yoğunluğu (BMD), kemik kaybı yarıçapı, postmenapozlu kadınlarda kırık oranı arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla Garnero ve ark (2007) bir çalışma yapmışlardır. Yaşları 31 ile 89 arasında değişen 669 tane postmenapozlu kadın çalışmaya dahil edilmiştir. Bu kadınların yıllık 25-OH-D_3 değerleri, BMD, kemik turnover markerleri, osteoporozun klinik risk faktörleri ölçülmüştür. Menapoz sonrası kadınlarda serum 25-OH-D_3 seviyesi ile radius kemik mineral yoğunluğu (BMD) ve kırık vakaları arasında bir ilişki olmadığını görmüşlerdir. Buna karşılık radyografinin de desteklediği sonuçlara göre yıllık kemik mineral yoğunluğundaki azalmaya paralel olarak 134 kadında kaza kırıkları olduğu, serum 25-OH-D_3 seviyesi azalırken, PTH miktarının arttığı, serum 25-OH-D_3 ile PTH arasında negatif korelasyon olduğu; ayrıca 25-OH-D_3 seviyelerinin yaşa bağlı bir değişiklik göstermediği gözlemlenmiştir.

Sahota ve ark(1999), yaptıkları çalışmada vitamin D yetersizliğinin vertebral osteoporozlu hastalarda kemik turnoverini ve kemik kaybını arttırıp arttırmadığını anlamaya çalışmışlardır. Bu çalışmada 119 yaşlı kadın 7 ay boyunca değerlendirmeye alınmıştır. Tüm hastalar, günlük yaşam aktiviteleri bakımından birbirinden bağımsız bırakılmışlardır. 25-OH-D_3 eksikliği bulunan hastalarda ALP ve PTH seviyeleri normal kadınlara göre daha yüksek; kemik mineral yoğunluğu daha düşük bulunmuştur. 25-OH-D_3 ve PTH arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir.

Leishmaniasisin köpeklerde kemik metabolizması üzerine etkisini araştırmak amacıyla yapılan bu çalışmada enfekte köpeklerin serum 25-OH-D_3 düzeyleri sağlıklı köpeklere göre düşük bulunmuştur. Ancak bu fark istatistiki değerlendirme açısından önemsizdir. 25-OH-D_3 kadınlarda özellikle menapoz sonrası oluşan osteoporoz ile

ilişkinini araştırmak amacıyla ölçülmüş ve bu hastalarda 25-OH-D₃ düzeyleri düşük, parathormon düzeyleri yüksek bulunmuş (Garneo ve ark 2007, Sahota ve ark 1999, Sahota ve ark 2004) ve kemik metabolizması ile ilgili olabileceği iddia edilmiştir. Köpeklerde yapılan çalışmalarda kronik böbrek yetmezliği (Galler ve ark 2011) veya iltihaplı bağırsak hastalığı (Gow ve ark 2011) olan hastalar da serum 25-OH-D₃ düzeyleri düşük, parathormon düzeyleri yüksek bulunmuştur. Yapılan araştırmada serum 25-OH-D₃ düzeyleri sağlıklı köpeklere düşük bulunmuş, ancak bu düşüş istatistik olarak önem taşımamaktadır. Bu sonuçlardan, leishmaniasisin enfekte köpeklerde farklı bulgulara neden olmasından, klinik olarak veya laboratuvar bulgusu olarak hastalığın spesifik bir semptomunun bulunmamasından dolayı ileri de yapılacak geniş kapsamlı, daha fazla hayvan sayısının materyal olarak kullanılacağı çalışmaların gerekli olduğunu kanısına varılabilir.

Yapılan bir çalışmada visseral leishmaniasisin karaciğerde fonksiyonu ve morfolojisi araştırılmıştır. Önceden leishmaniasisli olduğu bilinen yaşları 15 ile 60 arasında değişen erkek/kadın oranı 5:1 olan 18 hastanın karaciğerine perkütan yoluyla biyopsi yapılmıştır. Sonuç olarak leishmaniasisin, karaciğerde morfolojik ve fonksiyonel bozukluklara sebep olduğu gözlemlenmiştir. Karaciğer enzimlerinden ALP, ALT, LDH, GGT ve AST hasta hayvanlarda kontrollere göre oldukça yüksek bulunmuştur (El Hag ve ark 1994).

Davachi ve ark (2009), deneysel olarak fareleri *Leishmania major* ile enfekte etmişler ve Paramomisin'in tedavideki etkisini araştırmışlardır. Kontrol ve deneme gruplarında serum, bakır, çinko düzeyleri ile karaciğer enzimlerinden SGOT, SGPT, ALP enzimlerinin aktivitelerini ölçmüşlerdir. Sağlıklı ve enfekte farelerde Cu, Zn, SGOT ve SGPT seviyeleri arasında bir fark görülmemektedir, *Leishmania major* ile enfekte edilen grubun ALP düzeyleri önemli miktarda düşük bulunmuştur. Araştırmacıların asıl amaçlarının Paramomisin'in tedavideki etkisinin araştırılması olan çalışmada ilacın rodent modellerde kutanöz leishmaniasisin tedavisinde etkili rol oynadığı ve uygulanan dozlarda karaciğer üzerine toksik etkisinin olmadığı gösterilmiştir.

Rallis ve ark (2005), yaptıkları çalışmada *Leishmania infantum* ile enfekte olmuş 26 köpekten karaciğer doku ve kan örnekleri elde etmişlerdir. Bu hayvanların hiçbirinde

belli bir karaciğer büyümesi veya başka fiziksel bulgu, bir belirti veya karaciğer yetmezliğine dair bir bulgu görülmemiştir. 26 köpekten 19 tanesi eksfoliyatif deri iltihabı, 17 tanesi çevresel lenf bezleri hastalığı, 11 tanesi çene kası körelmesi, 10 tanesinde nasodijital hiperkeratoz, 7 tanesinde onikogrifozis ve vücutta zayıflık, 6 tanesinde ülseratif deri iltihabı ve göz nezlesi, 4 tanesinde bakteriyel, yüzeysel veya derinlemesine piyodermi ve blefarit, 3 tanesinde kornea iltihabı, 2 tanesinde üveit ve dalak büyümesi, 1 tanesinde keratokonjonktivit sika, poliartrit ve ülseratif ağız iltihabı görülmüştür. Hematolojik tetkiklere bakıldığında 21 köpekte anemi, 23 köpekte total protein miktarında artış, 6 köpekte düşük albuminemi, 15 köpekte ALP aktivitesinde artış, 2 köpekte hiperbilirubinemi, 4 köpekte post-brandial safra asidi konsantrasyonunda artış tespit etmişlerdir. Hiçbir köpekte ALT aktivitesi değişmemiştir. Anormal bulgu olarak sadece 19 köpeğin idrarında glomerüler proteinüri saptanmıştır.

Tyrphonas ve ark (1977), Leishmaniasisli 2 yaşında bir köpeği 6 ay boyunca izlemişler; hematolojik değerlerdeki değişikliklerin önemsiz, biyokimyasal parametrelerden ALP, ALT, SGOT, LDH ve kolesterolün normal değerlerin üstünde olduğunu tespit etmişlerdir. Kemik iliğinin incelenmesinde, plazma hücrelerinin ve retikuloendotelyal hücrelerinin sayıca artış gösterdiği gözlemlenmiştir.

Koutinas ve ark (2001), allopurinol ilaç tedavisiyle Can VL tedavisini araştırmışlardır. Çalışmaya doğal yollarla enfekte olmuş leishmaniasisli üremik olmayan toplam 45 köpek katılmıştır. Tanı serumda IFAT ve kemik iliği örneklerinde PCR ile konulmuştur. Enfekte köpeklerde hematokrit, lökosit, nötrofil, lenfosit, trombosit değerlerini referans değerlerle karşılaştırdıklarında düşük; total protein, kan üre nitrojeni, kolesterol, kreatinin, ALP, ALT, kreatin kinaz, laktat dehidrogenaz, P değerlerini yüksek bulmuşlardır.

Visseral leishmaniasisli insan ve köpeklerde yapılan araştırmalarda serum ALP düzeyleri kontrollere göre yüksek bulunmuştur (El Hag ve ark 1994, Rallis ve ark 2005, Tyrphonas ve ark 1977). Ancak Davachi ve ark (2009), deneysel olarak farelerde oluşturdukları leishmaniasiste ALP düzeylerini düşük bulmuşlardır. Sunulan araştırmada Leishmania ile doğal enfekte köpeklerin serum ALP düzeyleri araştırmacıların bulgularına

benzer şekilde yüksek bulunmuştur. Doğal ve deneysel leishmaniasisin serum ALP düzeyleri üzerine farklı etkiye neden olduğu düşünülebilir.

Paşa ve ark (2003), VL'li köpeklerin serumlarında çinko, demir, bakır, kalsiyum, fosfor ve magnezyum değerlerini ölçmüşlerdir. Materyal olarak VL'li 10 enfekte, kontrol grubu olarak 8 sağlıklı köpek kullanılmıştır. Enfekte köpeklerde çinko ve demir düzeyleri, sağlıklı köpeklere göre anlamlı olarak düşük, bakır değeri yüksek bulunmuştur. Kalsiyum, fosfor ve magnezyum değerlerinde önemli bir farklılık gözlemlenmemiştir. Cortadellas ve ark (2009), kronik böbrek yetmezliğinin değişik evrelerinde bulunan 155 leishmaniasisli köpek ile yaptıkları araştırmada hiperfosfatemi ile böbrek yetmezliğinin şiddeti arasında pozitif korelasyon bulmuşlardır. Kronik kala azarlı insanlarda böbreklerden tubular reabsorbsiyonun bir çalışmada, hastaların %94.6' sında hiponatremi, % 26'sında hipokalemi, % 27.2'sinde hipokloremi, % 32'sinde hipokalsemi, % 41.8'sinde hipomagnezemi görülmüş; idrarda sodyum, potasyum, klor, kalsiyum, inorganik fosfat, magnezyum, ürik asit atılımının arttığı bildirilmiştir (Verde ve ark2009).

Lal ve ark (2013), kronik ve akut VL'li köpeklerde serum, çinko, bakır, magnezyum, kalsiyum ve demir düzeylerini ölçmüşler, kronik hastalarda serum Zn düzeyleri düşük, Mg düzeyleri daha yüksek bulunmuştur. Fe ve Ca arasında önemli bir fark görülmemiş, Cu düzeyleri her iki grupta da yüksek bulunmuş. IFAT yöntemi ile leishmaniasis teşhisi koyduğumuz köpeklerde serum Ca düzeyleri *Leishmania* negatif gruba göre $p<0,001$ düzeyinde düşük, P düzeyleri ise yüksek bulunmuştur.

Yukarıda leishmaniasis ile ilgili sunulan çalışmalarda görüldüğü gibi serum Ca ve P düzeylerindeki bulgular farklıdır. Leishmaniasisde, Lal ve ark (2013) ile Verde ve ark (2009) hipokalsemi, Cortadellas ve ark (2009) hiperfosfatemi tespit ederken, Pasa ve ark (2003) serum Ca, Mg, P düzeylerinde bir farklılık saptamamışlardır.

Araştırmalar genel olarak değerlendirildiğinde Leishmaniasisle birlikte böbrek yetmezliği gelişen vakalarda hipokalsemi ve hiperfosfateminin şekillendiği görülmektedir. Yapılan araştırmada P ve Ca sonuçları; Cortadellas ve ark (2009)'nın araştırma

bulgularında elde ettikleri sonuçlardaki iddialarına paralel olarak enfekte köpeklerde böbrek yetmezliğinin olabileceğini düşündürmektedir.

SONUÇ

Leishmaniasis, dünyada gelişmiş ülkeler de dahil olmak üzere 88 ülkede yaklaşık 12 milyon insanı etkileyen ve dünya nüfusunun yaklaşık onda birinin risk altında bulunduğu bir protozoon enfeksiyonudur. Köpekler visseral formun rezervuarı olduklarından kompleks klinik özellikler içeren hastalığın erken dönemde teşhisi, leishmaniasisin kontrolünde önemli rol oynar. Can VL'nin etkeni vücuda *Phlebotomus*'ların konakçıdan kan emmesi esnasında bulaşır. Köpeklerde etken tüm vücuda yayılmadan ve semptomlar görülmeden önce, lokal bir deri yangısı gelişir. Konakçının immun durumuna bağlı olarak belirgin klinik belirtilerin ortaya çıkması bir aydan 7 yıla kadar sürer. Hastalığa yakalanan hayvanların immun yanıtına bağlı olarak hastalığın seyri asemptomatik veya semptomatik olabilmektedir. İmmun yanıtın güçlü olmasına göre parazitin kontrolü sağlanabileceğinden hastalığın seyri asemptomatik olarak devam edebilmektedir.

Klinik bulguların her zaman belirgin olmaması, belirtilerin hastaların bağışıklık sistemine bağlı olarak değişmesi hastalığın patofizyolojisinin aydınlatılmasını zorlaştırmaktadır. Araştırmada Can VL'li köpeklerde kemik metabolizmasının araştırılması amaçlanmıştır. Ancak araştırma sonuçlarında elde edilen bulgular, kemik metabolizması üzerine bir etkisinin olabileceğini düşündürmekte ancak hipotez için geçerli olabilmesi için yeterli olmadığı görülmektedir. ALP düzeyindeki yükseliş, hipokalsemi ve hiperfosfatemi sonuçları, kemik metabolizması üzerine olumsuz etkileri olabileceğini düşündürmektedir. Hipotezin kabul veya red edilebilmesi için daha fazla hayvan sayısı ile yapılacak; parathormon düzeyi ve kemik mineral yoğunluğunun da ölçüleceği ileri araştırmaların yapılması gerektiği kanısındayız.

ÖZET

Çalışmada leishmaniasisli köpeklerde kemik metabolizmasının ve buna bağlı olarak vitamin D, kalsiyum, fosfat ve ALP değerlerinin sağlıklı köpeklere göre nasıl bir değişim gösterdiğinin belirlenmesi amaçlandı.

Çalışmada IFA testi ile seropozitifliği saptanan 20 adet leishmaniasisli ve kontrol grubu olarak seronegatifliği belirlenen 20 adet 4 ile 6 yaşları arasındaki erkek köpek serumları değerlendirilmiştir.

Serum kalsiyum, fosfor miktarları kolorimetrik metotlarla, ALP düzeyi hazır ticari kit kullanarak spektrofotometrede, 25-OH-D₃ analizi ise ELISA'da ticari kit ile ölçüldü.

Leishmaniasisli ve kontrol grubu köpeklerin serum Ca seviyeleri (ortalama) sırasıyla 3,38 mg/100 ml ve 8 mg/100 ml olarak bulundu. İstatistiksel olarak iki grup arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü (p:0,000). Fosfor seviyeleri (ortalama) 3,01 mg/100 ml ve 2,19 mg/100 ml olarak tespit edildi. İki grup arasında (p:0,000) düzeyinde bir fark bulundu. Serum 25-OH-D₃ düzeyleri enfekte köpeklerde 51,89 nmol/L, kontrol grubunda ise 70,01 nmol/L olarak saptandı. İstatistiksel olarak iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı (p:0,252). Leishmaniasisli ve kontrol grubu köpeklerin serum ALP seviyeleri (ortalama) sırasıyla 137,1 U/L ve 104,5 U/L olarak bulundu. İstatistiksel olarak iki grup arasında anlamlı bir fark olduğu (p:0,026) görüldü.

Alkalin fosfataz düzeyindeki yükseliş, hipokalsemi ve hiperfosfatemisi sonuçları, leishmaniasisin kemik metabolizması üzerine olumsuz etkileri olabileceğini düşündürmektedir.

SUMMARY

Investigation of Bone Metabolism in Dogs with Leishmaniasis

In the present study, it was aimed to determine bone metabolism related changes in dogs with leishmaniasis such as vitamin D, calcium, phosphate and ALP levels then compared to healthy ones.

Sera of 20 male dogs with leishmaniasis and 20 healthy male dogs were used; the seropositivity of all cases was previously tested by IFAT.

Serum phosphorus and calcium levels were measured by colorimetric methods, ALP levels were measured at spectrophotometer with using a commercial kit and 25-OH-D₃ levels was measured with an ELISA kit.

The mean serum calcium levels in dogs with and without *Leishmania* infection were found as 3,38 mg/100 ml and 8 mg/100 ml, respectively. The difference between two groups was statistically significant (p:0,000). Additionally, Phosphorus levels (average) were 3,01 mg/100 ml and 2,19 mg/100 ml, respectively. This difference was also statistically significant (p:0,000). Among dogs with leishmaniasis the average serum 25-OH-D₃ level was measured as 51,89 nmol/L and was measured as 70,01 nmol/L among healthy dogs. Statistically, there was no significant difference between two groups in serum 25-OH-D₃ levels (0,252). The ALP levels among infected and non-infected dogs serum were measured as 137,1 U/L and 104,5 U/L, respectively. Statistically, there was a significant difference between two groups (p:0,026).

It can be concluded that leishmaniasis may have negative effects on bone metabolism among dogs according to our findings: the increase in serum ALP levels, hypocalcaemia and hypophosphatemia.

REFERANSLAR

Ak M , Özbel Y, Özensoy S, Turgay N. Visseral Leishmaniasis İmmun yetmezlikte önemi artan parazit hastalıkları. Editör. Özcel M A. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları. Ege Üniversitesi Basım Evi-Bornova. İzmir, 1995; s: 69-107.

Akbel E. Yüksek protein içeren diyetle beslenen sıçanlara atkestanesi ekstresi verilmesinin kemik ve kalsiyum metabolizmasına etkileri. Doktora Tezi, Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi, Afyonkarahisar, Türkiye. 2005.

Baneth G, E Shaw S. Chemotherapy of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. 2002; 106(4): 315-324.

Baneth G, Schnur LF, Keren E, Aroch I, ZuriG, Harrus S, Jaffe L. Canine visceral leishmaniasis in central Israel – an emerging zoonosis. *Journal of Israel Veterinary Medicine*. 1997; 52(1):24

Bellinger JF, Campbell RA. Determination of serum calcium by glyoxal bis (2-hydroxyanil) chelation. *Am Assoc Clinical Chemistry* 1965.

Bettini S, Gradoni L. Canine leishmaniasis in the Mediterranean area and its implications for human leishmaniasis. *Insect Sci Appl*, 1986; 7: 241-245

Buracco P, Abate O, Guglielmino R, Morello E. Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with *Leishmania donovani* infection in a dog. *J Small Anim Pract*. 1997; 38(1): 29-30.

Ciaramella P, Oliva G, Luna R D, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, Scalone A, Persechino A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec*. 1997; 141: 539–543.

Coşkun ŞZ, Batmaz H, Aydın L, Yılmaz F. Seroprevalance of *L.infantum* infection of dogs in the western part of Turkey. *Türkiye Parazitol Derg*. 1997; 21(3): 287-291.

Cortadellas O, Fernandez Del Palacio MJ, Talavera J, Bayon A. Calcium and phosphorus homeostasis in dogs with spontaneous chronic kidney disease at different stages severity. *J Vet Intern Med* 2010; 24: 73-79.

Cortadellas O, Fernandez Del Palacio MJ, Talavera J, Bayon A. Serum phosphorus concentrations in dogs with leishmaniasis at different stages of chronic kidney disease. *Veterinary Record* 2009; 164: 487-490.

Costa S, D'Olivera A, Bacellar O, Carvalho EM. T Cell Response of Asymptomatic *L. chagasi* Infected Subjects to Recombinant Leishmania Antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1999; 94(3): 367–370.

Çetiner S., Öztürk M., Yücetaş Ş. Determination of serum alkaline phosphatase, calcium and phosphate levels after the clinical use of solvent dehydrated allogenic bone implantation in cystic cavities. *Hacettepe Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*. 2001; (25): 26-30.

Davachi S, Nahrevanian H, Omidinia E, Hajhosseini R, Amini M, Farahmand M, Mirkhani F, Javadian S. Biochemical Alterations of Liver Enzymes and Microelements During *Leishmania Major* Infection in Balb/C Mice after Treatment with Paromomycin. *Pharmacologyonline* 2009; 3: 424-436.

Davies JL, Andrews GS, Miller R, Owen HG. Comparison of the Stannous Chloride and Vanadate methods for Estimation of Serum Inorganic Phosphorus by use of the “SMA 12/60”, *Clinical Chemistry* 1973; 19(4) 411.

Desjeux, P. Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis. *Medical Microbiology and Immunology*. 2001; 190(1-2): 77-79.

Desjeux P. Leishmaniasis: Current Situation and New Perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2004; 27(5): 305-18

Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2001; 95(3): 239-243.

Desjeux, P. Information on the epidemiology and control of the leishmaniasis by country or territory. Document WHO/ LEIS/91.30. WHO, Geneva, Switzerland, 1991.

Dittmer KE, Thompson KG, Vitamin D Metabolism and Rickets in Domestic Animals. Veterinary Pathology. 2011; 48(2): 389-407.

Driel M, Koedam M, Buurman CJ, Hewison M, Chiba H, Uitterlinden AG, Pols HAP, Van Leeuwen J. P. T. M. Evidence for auto/paracrine actions of vitamin D in bone: 1-hydroxylase expression and activity in human bone cells. The FASEB Journal. 2006; 20: 1811-1819.

Eastell, R., Baumann, M., Wiczorek, L. Bone Markers: Biochemical and clinical perspectives, Informa Health Care. 2001.

Ecer S, Dikici B, Hasbolat K. Kronik karaciğer hastalarında kemik mineral metabolizması, Dicle Tıp Dergisi. 2005; 32: 57-62.

El Hag IA , Hashim FA , El Toum IA , Homeida M , El Kalifa M , El Hassan AM. Liver morphology and function in visceral leishmaniasis (Kala-azar). J Clin Pathol 1994; 47: 547-551.

Elçi A. Postmenopozal kadınlarda serum total osteokalsin ve gamma karboksiglutamit kalıntısı taşımayan osteokalsin oranı ile kemik mineral dansitesi ölçümünün karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi. T. C. Sağlık Bakanlığı, Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Bölümü. İstanbul. 2004.

Encinas Grandes A, Gomez-Bautista M, Martin Novo M, Simon Martin F. Leishmaniasis in the province of Salamanca Spain. Prevalence in dogs and seasonal dynamics of vectors. Ann Parasitol Hum Comp 1988; 63: 387-397.

Engwerda CR, Kaye PM. Organ-specific immune responses associated with infectious disease. *Immunology Today*. 2000; 21(2): 73-78.

Ersoy E, Bayşu N. Biyokimya, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları No: 408 Ders Kitabı. Ankara.1986.

Ertabaklar H, Özensoy Töz S, Şakru N, Keleş E, Özbel Y. Muğla ili Göktepe köyünde çocuklarda ve köpeklerde visseral leishmaniosisin araştırması. *T Parazitol Derg.* 2001; 25(2): 128-131.

Fidan, AF., Dünder, Y. *Yucca schidigera* ve içerdiği saponinler ile fenolik bileşiklerinin, hipokolesterolemik ve antioksidan etkileri (derleme). *Lalahan Hay. Araşt. Enst.Derg.* 2007; 47(2): 31-39.

Frederic L, James J. Cultivation of clinically significant hemoflagellates, *Clinical Microbiology Reviews*, 2002; 15(3): 374–389.

Freitas JCC, Nunes-Pinheiro DCS, Neto BEL, Santos GJLS, Abreu CRA, Braga RR, Campos RM, Oliviera LF. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania Chagasi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2012; 45(1): 24-29.

Gallego S.L. *Leishmania infantum* and dog: Immunological and epidemiological studies about infection and diseases. Tesi doctoral, Facultat de veterinaria, Universitat autonoma de Barcelona, Spain. 2001.

Galler A, Tran JL, Krammer Lukas U, Höller U, Thalhammer JG, Zentek J, Willmann M. Blood vitamin levels in dogs with chronic kidney disease. *The veterinary Journal*. 2011

Garnero P, Munoz F, Sornay-Rendu E, Delmas PD. Associations of vitamin D status with bone mineral density, bone turnover, bone loss and fracture risk in healthy postmenopausal women. *The OFELY study. Bone*. 2007; 40: 716-722.

Gothe R. Leishmaniasis in dogs in Germany: aetiology, biology, epidomology, clinic, pathogenesis, diagnosis, theraphy and disease prevention. *Kleintier Prax* 1991; 36: 69-84.

Gow AG, Else Rİ Evans H, Berry JLI, Herrtage MEİ, Mellanby RJ. Hpovitaminosis in dogs with inflammatory bowel disease and hypoalbuminaemia. *Journal of Small Animal Practice*. 2011; 52: 411-418.

Gönül R, Arun SS, Dodurka T, Handemir E. Bir Köpekte *Leishmania infantum* Olgusu. *Turk J Vet Anim Sci* 2002; 26: 689-694.

Handemir E, Kaya N, Şenlik B, Kamburgil K. Askeri Personelde Visseral Leishmaniasis Seroprevalansı, *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 2002; 26(1): 31-33.

Horwitt BN. Determination of İnorganic Serum Phosphate By Means of Stannous Chloride. *Journal of Biochemical Chemistry*, 1952;199(2): 537-541

Ikonomopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A. Molecular diagnosis of leishmaniasis comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples, *Veterinary Parasitology*. 2003; 113: 99–113.

Kalaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamhoğlu, M., Başınar, N., Tiftik, A. Biyokimya, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 2006. s:55.

Kalaycıoğlu L, Serpek B, Nizamhoğlu M, Başınar N, Tiftik A.M Biyokimya: 2. Baskı Ankara: Nobel Yayınevi, 2000. s:274.

Kamburgil K, Dik B. Köpeklerde Visseral Lieshmaniosis'in İndirekt Fluoresan Antikor Testi (IFAT) ile Tespiti. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 1998; 22(4): 348-353.

Kaneko, J.J. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* 4th Edition ,Academic pres Inc.,San Diego California 1989, p: 678-752.

Kirmse P, Mahin L, Lahrech TM. Canine Leishmaniasis in Morocco with special reference to infantile kala-azar. *Trans R Trop Med Hyg* 1987; 81(2); 212-213.

Korkmaz M, Ok Ü Z. Parazitolojide Laboratuvar. Özcel MA, Üner A, Ertuğ S. Parazitolojide İmmunofluoresans. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 23. ISBN 978-605-87556-0-4. İzmir 2011. s: 209-219.

Koutinas K, Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides L, Polizopoulou Z, Billinis C, Argyriadis D, Diakou N, Papadopoulos O. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniasis. 2001; 98(4): 247-261.

Lainson R, Shaw J J. Evolution, classification and geographical distribution. In Peters W & Killick-Kendrick R, editors . *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, vol. Orlando: Academic Press, 1987. p: 1-120.

Lal CS, Kumar S, Ranjan A, Rabidas VN, Verma N, Pandey K, Verma RB, Das S, Singh D, Das P. Comparative analysis of serum zinc, copper, magnesium, calcium and iron level in acute and chronic patients of visceral leishmaniasis. *J Trace Elem Med Biol.* 2013; 27(2):98-102.

Markell EK, John DT, Krotoski WA. Markel and Voges's Medical Protozoology. 8th Edition, WB Saunders Company. 1999; 123-188.

Marty P, Lelievre A, Quaranta JF, Suffia I, Eulalio M, Gari-Toussaint M. Detection by Western Blot of Four Antigens Characterizing Acute Clinical Leishmaniasis due to *Leishmania Infantum*. *Trans R Soc Med Hyg*, 1995; 89: 690-691.

Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 5515-5519.

Michael FH. Vitamin D Deficiency Medical Progress. The new England Journal of Medicine. Boston: Jul 19 2007; 357(3): 266.

Molano I, Alonso MG, Mirón C, Redondo E, Requena JM, Soto M, Nieto CG, Alonso C. A Leishmania infantum multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with L. infantum. Vet Immunol Immunopathol. 2003; 92(1-2): 1-13.

Montgomery, R, Conway, TW, Spector, AA. Biyokimya-olgu sunumlu yaklaşım. Palme Yayıncılık. Ankara.2000.

Murray HW. Clinical and Experimental Advances in Treatment of Visceral Leishmaniasis. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45: 2185-2197.

Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper'ın Biyokimyası. Çevirenler: Menteş, G., Ersöz, B., Nobel TıpKitabevleri, İstanbul 2004.

Nillson LP, Granström G. Changes of serum alkaline phosphatase following mandibular osteotomy in the rat. J. Dent. Res. 1987; 66: 1195-1198.

Nunes VLB, Yamamoto YY, Rego Junior FA, Dorval MEC, Galati EAB, Oshiro ET, Rodrigues M. Epidemiological aspects of visceral leishmaniasis in dogs in Corumba, Mato Grosso do Sul. Pesquise Vet Brazil. 1988; 8: 17-21.

Ok ÜZ, Balcioğlu İC, Özkan AT, Özensoy S, Özbek Y. Leishmaniasis in Turkey. Acta Tropica 2002; 84: 43-48.

Oleszek W, Marston A. Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal. Kluwer Academic Publishers. 2000; p:260.

Onat T, Sönmez E, Emek K. İnsan Biyokimyası Palme Yayıncılık. 2002; s: 213-220.

Özbel Y, Turgay N, Alkan MZ, Babaoglu A, Özensoy Töz S, Babalioğlu N. Batı Karadeniz Bölgesinde zoonotik Visceral Leishmaniasis Odağı: Karabük. Türkiye Parazitoloji Dergisi. 2002; 26(4): 362-366.

Özbel Y, Oskam L, Özensoy S, Turgay N, Alkan MZ, Jafle CL, Özcel MA. Epidemiology of canine leishmaniasis in western Turkey: comparison of serological, molecular biological and parasitological procedures. *Acta Tropica*; 2000: 74(1): 1-6.

Özcel MA, Özbel Y, Ak Mucide, Tıbbi Parazit Hastalıkları. Editör. Özcel M A. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No. 22 . Ege Üniversitesi Meta Basım- Bornova. İzmir, 2007; 200-201

Özcel MA. Parazit Hastalıklarında Tanı 1. Baskı. İzmir, Ege Üniversitesi Basımevi, 1997

Özcel MA. GAP'ı Tehdit Eden Parazit Hastalıkları. 1. Baskı, İzmir, Ege Üniversitesi Basımevi, 1995; 97-131.

Özçelik S. Kamçılı Protozoonlar ve Yaptıkları Hastalıklar, Ustaçelebi Ş. Editör. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitapevi. 1999; 1191–1207.

Özensoy S, Özbel Y, Turgay N. Serodiagnosis and epidemiology of Visceral Leishmaniasis in Turkey, *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59: 363–369.

Özensoy Töz S, Korkmaz M, Balcıoğlu İC, Özbel Y, Ertabaklar H. Karaburun ve Urla Bölgesinde Zoonotik Visceral Leishmaniasis. *Türkiye Parazit Derg*, 2002: 26(3); 234-238.

Papadopoulou C, Kostoula A, Dimitriou D, Panagiou A, Bobojianni C, Antoniadis G. Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern Greece. *Journal of Infection*. 2005; 50(1): 53-60.

Paşa S, Kargin F ,Bildik A, Seyrek K, Ozbel Y, Ozensoy S. Serum and Hair Levels of Zinc and Other Elements in Dogs with Visceral Leishmaniasis. *Biological Trace Element Research.* 2003; 94(2): 141-147

Paşa S, Özensoy Toz S, Voyvoda H, Özbel Y. Clinical and serological follow up in dogs with visceral leishmaniasis treated with allopurinol and sodium stibogluconate. *Veterinary Parasitology.* 2005; 128(3-4): 243-249.

Pineda, M.H. Mc Donald's Veterinary Endocrinology and Reproduction, Iowa State Pres. 2003. s:102.

Rallis T, Day MJ, Saridomichelakis MN, Adamama-Moraitou KK,Papazoglou L, Fytianou A,Koutinas AF. Chronic Hepatitis Associated with Canine Leishmaniosis (*Leishmania infantum*): A Clinicopathological Study of 26 Cases. *J. Comp. Path.* 2005; 132; 145-152.

Rosario EY, Genaro O, Silva J, Costa R. Evolution of enzyme-linked immunosorbent assay using crude leishmania and recombinant antigens as a diagnostic marker for Canine Visceral Leishmaniasis, *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 2005; 100(2): 197–203.

Sahota O, Masud T, San P, Hosking J. Vitamin D insufficiency increases bone turnover markers and enhances bone loss at the hip in patients with established vertebral osteoporosis. *Clinical Endocrinology.* 1999; 51: 217-221.

Sahota O, Munday MK, San P, Godber IM, Lawson N, Hosking DJ. The relationship between vitamin D and parathyroid hormone calcium homeostasis, bone turnover, and bone mineral density in postmenopausal women with established osteoporosis. *Bone.* 2004; 35(1) 312-319.

Saygi G. Temel Tıbbi Parazitoloji 1.Baskı Esnaf Ofset Matbaacılık. Sivas 1998; 58-67.

Schallig HDFH, Schoone GJ, Beijer EGM, Kroom CCM, Ozbel Y, Ozbensoy S, Da Silva E.S, Cardoso LM, Da Silva ED. Development of a fast agglutination screening

test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs. Vet Parasitol. 2002; 109(1-2): 1-8.

Silva DA, Madeira MD, Abrantes TR, Filho CJ, Figueiredo FB. Assessment of serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. The Veterinary Journal 2012; 195(2): 252-253.

Töre O. Protozooloji, Kılıçturgay K. Editör. Temel Mikrobiyoloji ve Parazitoloji, 2.Baskı. İstanbul: Bursa Güneş&Nobel Tıp Kitabevleri, 1996; 251–267.

Töz SÖ, Korkmaz M, Balcıoğlu İC, Özbel Y, Ertabaklar H. Karaburun ve Urla Bölgesi'nde Zoonotik ve visseral Leishmaniosis. T Parazitol Derg. 2002; 26(3): 234-238.

Tryphonas L, Zavidzka Z, Bernard MA, Janzen EA. Visceral leishmaniasis in a dog: Clinical, hematological and pathological observations. Can. J. Comp. Med. 1977; 41(1): 1-12.

Tryfonidou MA, Holl MS, Oosterlaken-Dijksterhuis MA, Vastenburg M, Van Den Brom WE, Hazewinkel H.A.W. Growth hormone modulates cholecalciferol metabolism with moderate effects on intestinal mineral absorption and specific effects on bone formation in growing dogs raised on balanced food. Domestic Animal Endocrinology. 2003; 25: 155-174.

Unat EK, Leishmaniaların tarihçesi, Leishmaniasis, Yaşarol Ş, (ed).1981; s.1-10.

Unat E K, Yücel A, Altas K, Samastı M. Unat'ın Tıp Parazitolojisi. İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları. İstanbul 1991; s.5.

Uzunoğlu N. Alkalen Fosfataz enziminin fizikokimyasal özellikleri, T. Klinikleri Tıp Bilimleri. 1998; (18): 69-75.

Verde F A A L, Verde F A L, Daher E De F, Santos G M Dos, Saboia Neto A, Verde E M L. Renal Tubular Dysfunction in Human Visceral Leishmaniasis (Kala-azar). *Clinical Nephrology* 2009; 71(5): 492-500.

Weigle KA, Labrada LA, Lozano C, Santrich C, Douglas C. PCR-Based Diagnosis of Acute and Chronic Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002; 40(2): 601–606.

Yenson M. İnsan Biyokimyası. Besinci Baskı, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 1984. 150, 388,675

Yaman K. Fizyoloji, Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayın No:143, Bursa.1999.

Yıldırım S. Antik insan ve Kuzey Doğu Anadolu step filinin (*Elephans trogontherii*-mamut) kemiklerinde alkalin fosfataz enziminin aranması ve tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, Türkiye, 2001.

ÖZGEÇMİŞ

Aydın ilinin Söke ilçesinde 17.12.1981 yılında doğdu. İlkokulu; Fahrettin Uyguntüzel İlköğretim Okulu'nda, Ortaokul ve Liseyi Söke Hilmi Fırat Anadolu Lisesi'nde tamamladı. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü'nden mezun oldu. 3 seneye yakın Adnan Menderes Uygulama ve Araştırma Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarı'nda çalıştı. Halen aynı kurumda Satınalma ihale biriminde memur olarak çalışmaktadır.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü eksik etmeyen hocalarım ADÜ Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ayşegül Bildik'e, ADÜ Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Sema Ertuğ'a, Prof. Dr. Hatice Ertabaklar'a; Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Funda Kıral ve Doç. Dr. Pınar Alkım Ulutaş'a, yüksek lisans tez aşamasındaki yardımlarından dolayı Doktora ve Yüksek Lisans öğrencileri Serçin Özlem, Erdoğan Malatyalı, Gamze Tosun'a, ADÜ Uygulama ve Araştırma Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarı'nda görevli teknisyen Kerim Çolak'a sonsuz destek ve anlayışlarından dolayı teşekkür ederim.

Aileme, sabır, özveri ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.