

T.C.  
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA (VETERİNER)  
DOKTORA PROGRAMI

**LEİSHMANİASİS'İN FARKLI EVRELERİNDEKİ  
KÖPEKLERDE FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRÜ-23 VE  
ALFA-KLOTHO KONSANTRASYONLARI İLE İLİŞKİLİ  
PARAMETRELERİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**GAMZE GÜLTEKİN  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ**

Bu tez TÜBİTAK tarafından 220O046 proje numarası ile desteklenmiştir.

**AYDIN-2022**

## KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Veteriner) Doktora Programı çerçevesinde Gamze GÜLTEKİN tarafından hazırlanan “Leishmaniasis’in Farklı Evrelerindeki Köpeklerde Fibroblast Büyüme Faktörü-23 ve Alfa-Klotho Konsantrasyonları ile İlişkili Parametrelerin Değerlendirilmesi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 04/07/2022

- Üye : Prof. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ Aydın Adnan Menderes  
(T.D.) Üniversitesi
- Üye : Prof. Dr. Funda KIRAL Aydın Adnan Menderes  
Üniversitesi
- Üye : Prof. Dr. Hüseyin VOYVODA Aydın Adnan Menderes  
Üniversitesi
- Üye : Prof. Dr. Zafer BULUT Selçuk Üniversitesi
- Üye : Doç. Dr. Metin ÖĞÜN Kars Kafkas Üniversitesi

### ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün ..... tarih ve ..... sayılı oturumunda alınan ..... nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdürü V.

## TEŞEKKÜR

Aydın Adnan Menderes Üniversite Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki doktora eğitimim süresince tecrübe, bilgi ve emeğini hoşgörü ile paylaşan ve bana her konuda destek olan değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ'a,

Bilgi, deneyim ve desteklerini özveriyle aktaran değerli hocalarım, Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Funda KIRAL'a, Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK'e ve Doç. Dr. Serap ÜNÜBOL AYPAK'a,

Doktora tez çalışmamda bilgi ve desteklerini esirgemeyen Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Hüseyin VOYVODA'ya ve Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hatice ERTABAKLAR'a,

Biyokimyasal analizleri gerçekleştirme sürecindeki yardımlarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Dr. Gamze Sevri EKREN AŞICI'ya ve Doktora Öğrencisi Bilgehan AKAR'a,

Doktora Tezimin laboratuvar çalışmaları sırasında büyük yardımlarını gördüğüm kıymetli çalışma arkadaşım Sıla DEMİR'e ve Veteriner Hekim Gizem GÖNÜLVEREN'e,

Geride kalan bu süreçte sabrı, her konudaki desteği ve bilgi birikimiyle hep yanımda olan sevgili eşim Doç. Dr. Mehmet GÜLTEKİN'e,

Varlıklarını ve desteklerini hep hissettiğim sevgili ablamız Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Berna KORKMAZGİL ve değerli eşi Özyay KORKMAZGİL'e,

Her zaman yanımda olan aileme ve dostlarıma,  
En içten sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY .....	i
TEŞEKKÜR .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT .....	ix
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Leishmaniasis .....	3
2.2. Kalsiyum-Fosfor Metabolizması.....	9
2.3. Fibroblast Büyüme Faktörü-23 ve $\alpha$ -Klotho .....	11
2.4. Kronik Böbrek Hasarı ile Fibroblast Büyüme Faktörü-23 ve $\alpha$ -Klotho'nun İlişkisi .....	14
3. GEREÇ ve YÖNTEM .....	17
3.1. Hayvan Materyali .....	17
3.1.1. Sağlıklı Köpekler.....	17
3.1.2. Leishmaniasis'li Köpekler.....	17
3.2. Laboratuvar Analizler .....	19
3.2.1. Örneklemeler, Örneklerin Saklanması ve Analizler .....	19
3.2.1.1. FGF-23 Analizi .....	20
3.2.1.2. Alfa-Klotho ( $\alpha$ -Klotho) Analizi .....	21

3.2.1.3. 25(OH)D3 Vitamini Analizi.....	21
3.2.1.4. Parathormon (PTH) Analizi .....	22
3.3. Verilerin Sunulması ve İstatistiksel Değerlendirme.....	23
4. BULGULAR.....	24
4.1. Leishmaniasis’li Köpeklerde Serolojik, Hematolojik ve Biyokimyasal Bulgular .....	27
4.2. Leishmaniasis’li Köpeklerde Evrelere Göre Hematolojik ve Biyokimyasal Bulgular .....	31
5. TARTIŞMA .....	36
6. SONUÇ ve ÖNERİLER .....	43
KAYNAKLAR.....	44
EKLER .....	54
Ek-1 (ADÜ-HADYEK).....	54
Ek – 2 (BİLGİ ONAM FORMU).....	55
BİLİMSEL ETİK BEYANI .....	56
ÖZ GEÇMİŞ .....	57

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ALP</b>	: Alkalen Fosfataz
<b>ALT</b>	: Alanin Aminotransferaz
<b>AST</b>	: Aspartat Aminotransferaz
<b>CLWG</b>	: Köpek Leishmaniasis Çalışma Grubu
<b>ELISA</b>	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
<b>FGF-23</b>	: Fibroblast Büyüme Faktörü-23
<b>GGT</b>	: Gama Glutamil Transferaz
<b>HCT</b>	: Hematokrit Değer
<b>IFAT</b>	: İndirekt Fluoresan Antikor Testi
<b>Ig</b>	: Immunoglobulin
<b>IRIS</b>	: Uluslararası Renal İlgî Derneği
<b>KBH</b>	: Kronik Böbrek Hastalığı
<b>MCHC</b>	: Ortalama Eritrosit Hemoglobin Konsantrasyonu
<b>MCV</b>	: Ortalama Eritrosit Hacmi
<b>Na</b>	: Sodyum
<b>PCR</b>	: Protein Zincir Reaksiyonu
<b>PLT</b>	: Trombosit Sayısı
<b>PTH</b>	: Parathormon
<b>RBC</b>	: Eritrosit Sayısı
<b>Rho</b>	: Korelasyon Katsayısı
<b>VL</b>	: Viseral Leishmaniasis
<b>WBC</b>	: Total Lökosit Sayısı
<b><math>\alpha</math>-Klotho</b>	: Alfa-Klotho

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.</b> Kalsiyum-fosfor dengesinin sağlanmasında görevli bileşenlerin etkileşimleri .....	12
<b>Şekil 2.</b> FGF-23 ve $\alpha$ -Klotho düzeylerindeki değişimlerin etkileri .....	13
<b>Şekil 3.</b> Kronik böbrek hastalığının farklı evrelerinde gözlenen muhtemel değişiklikler .....	14
<b>Şekil 4.</b> Çalışmada değerlendirilen Evre II Leishmaniasis’li bir olgu .....	25
<b>Şekil 5.</b> Çalışmada değerlendirilen Evre III Leishmaniasis’li bir olgu.....	26
<b>Şekil 6.</b> Çalışmada değerlendirilen Evre IV Leishmaniasis’li bir olgu.....	26
<b>Şekil 7.</b> Sağlıklı ve Leishmaniasis’li köpeklerde FGF23 (a), $\alpha$ -Klotho (b), Vitamin D (c), Parathormon (d), Kalsiyum (e) ve Fosfor (f) düzeyleri .....	30
<b>Şekil 8.</b> Sağlıklı ve evrelere göre Leishmaniasis’li köpeklerde FGF23 (a), $\alpha$ -klotho (b), Vitamin D (c), Parathormon (d), Kalsiyum (e) ve Fosfor (f) düzeyleri.....	35

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> IRIS standartlarına göre köpeklerde kronik böbrek yetmezliğinin sınıflandırılması..	7
<b>Tablo 2.</b> Köpeklerde Leishmaniasis'in Leishvet grubu tarafından önerilen evrelendirilmesi...	18
<b>Tablo 3.</b> Değerlendirilen laboratuvar parametreler, ölçüm amaçları ve yöntemleri.....	22
<b>Tablo 4.</b> Kullanılan cihazlar ve kullanım amacı.....	23
<b>Tablo 5.</b> Sağlıklı ve Leishmaniasis'li köpeklerde demografik bulgular.....	24
<b>Tablo 6.</b> Sağlıklı ve Leishmaniasis'li köpeklerde belirlenen IFAT değeri ve hematolojik bulgular .....	27
<b>Tablo 7.</b> Sağlıklı ve Leishmaniasis'li köpeklerde belirlenen rutin biyokimyasal parametreler .....	28
<b>Tablo 8.</b> Sağlıklı ve Leishmaniasis'li köpeklerde plazma FGF23 ve serum $\alpha$ -Klotho konsantrasyonları ile kalsiyum-fosfor metabolizması parametreleri.....	29
<b>Tablo 9.</b> Leishmaniasis'li köpeklerde FGF-23 ve $\alpha$ -Klotho ile kalsiyum-fosfor metabolizması ve böbrek fonksiyonuna ilgili parametreler arasındaki korelasyonlar.....	31
<b>Tablo 10.</b> Sağlıklı ve Leishmaniasis'li köpeklerde evrelere göre IFAT değeri ve hematolojik bulgular .....	32
<b>Tablo 11.</b> Sağlıklı ve Leishmaniasis'li köpeklerde evrelere göre rutin biyokimyasal parametreler .....	33
<b>Tablo 12.</b> Sağlıklı ve Leishmaniasis'li köpeklerde evrelere göre plazma FGF-23 ve serum $\alpha$ -Klotho değerleri ile kalsiyum-fosfor metabolizması parametreleri .....	34



## ÖZET

### LEISHMANİASİS'İN FARKLI EVRELERİNDEKİ KÖPEKLERDE FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRÜ-23 VE ALFA-KLOTHO KONSANTRASYONLARI İLE İLİŞKİLİ PARAMETRELERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Gültekin G. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya (Veteriner) Programı, Doktora Tezi, Aydın, 2022.

**Amaç:** Bu çalışmada sağlıklı ve Leishmaniasis'in farklı evrelerindeki köpeklerde Fibroblast Büyüme Faktörü-23 (FGF-23) ve  $\alpha$ -Klotho konsantrasyonlarının belirlenmesi, böbrek fonksiyonu temelinde yapılan hastalığın evrelendirmesinde parametrelerin değişimlerinin ve kalsiyum-fosfor metabolizmasında önemi olan diğer metabolitlerle ilişkisinin ortaya konması amaçlandı.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmada 22 sağlıklı, 52 Leishmaniasis'li olmak üzere her iki cinsiyetten, farklı yaş ve orta büyüklükteki ırklardan toplam 74 köpek kullanıldı. Leishmaniasis'li köpekler klinik ve laboratuvar bulgular temelinde Leishvet önerilerine göre Evre I (n=16), Evre II (n=14), Evre III (n=9) ve Evre IV (n=13) olarak gruplandırıldı. Tek örnekleme ile rutin hemato-biyokimyasal parametreler yanında plazma FGF-23 ve serum  $\alpha$ -Klotho, üre, kreatinin, fosfor, kalsiyum, parathormon, vitamin D konsantrasyonları ve idrar protein/kreatinin oranı ölçüldü. Sağlıklı köpeklerin verileri, genel ve evrelere göre Leishmaniasis'li köpeklerle karşılaştırıldı.

**Bulgular:** Leishmaniasis'li köpeklerde FGF-23 ( $p<0.05$ ),  $\alpha$ -Klotho ve parathormon değerleri yüksek ( $p<0.001$ ), D vitamini ve kalsiyum konsantrasyonları ise düşük ( $p<0.001$ ) bulundu. FGF-23 konsantrasyonu Evre IV'de diğer tüm evrelerden yüksekti.  $\alpha$ -Klotho düzeyindeki farklılıklar ise evreler arasında anlamlı değildi. FGF-23 düzeyi ile üre, kreatinin konsantrasyonları zayıf ve idrar protein/kreatinin oranı arasında orta düzeyde pozitif korelasyon belirlenirken,  $\alpha$ -Klotho ile diğer parametreler arasında korelasyon belirlenemedi.

**Sonuç:** Leishmaniasis'li köpeklerde FGF-23 ve  $\alpha$ -Klotho düzeylerindeki artış ilk defa gösterildi. FGF-23 düzeyindeki artışların hastalığın ilerleyen evrelerinde daha belirgin olduğu ve üre, kreatinin konsantrasyonlarındaki artışla uyumlu olduğu görüldü. Elde edilen bulguların Leishmaniasis'de görülen böbrek hastalığının patofizyolojisinin açıklanmasına yönelik ileride gerçekleştirilecek tanısal ve tedaviye yönelik çalışmalara kaynak oluşturabileceği düşünüldü.

**Anahtar Kelimeler:** FGF-23, Köpek, Leishmaniasis,  $\alpha$ -Klotho.

## ABSTRACT

### EVALUATION OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR-23 AND ALPHA-KLOTHO CONCENTRATIONS AND RELATED PARAMETERS IN DOGS WITH DIFFERENT STAGES OF LEISHMANIASIS

**Gultekin G. Aydın Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Biochemistry Program, Doctorate Thesis, Aydın, 2022.**

**Objective:** In the present study, it was aimed to determine the levels of Fibroblast Growth Factor-23 (FGF-23) and  $\alpha$ -Klotho in healthy dogs and dogs with different stages of Leishmaniasis, to reveal the changes in the staging of the disease based on kidney function and the relationship with other metabolites that are important in calcium-phosphorus metabolism.

**Material and Methods:** In the study, 74 dogs of both sexes, different ages, and medium-sized breeds, 22 healthy, 52 with Leishmaniasis, were used. Dogs with Leishmaniasis were grouped as Stage I (n=16), Stage II (n=14), Stage III (n=9) and Stage IV (n=13) according to Leishvet's recommendations based on clinical and laboratory findings. In addition to routine hemato-biochemical parameters, plasma FGF-23 and serum  $\alpha$ -Klotho, urea, creatinine, phosphorus, calcium, parathormone, vitamin D levels and urine protein/creatinine ratio were measured. The data of healthy dogs were compared to dogs with Leishmaniasis and according to stages.

**Results:** Dogs with leishmaniasis had high FGF-23 ( $p<0.05$ ),  $\alpha$ -Klotho and parathormone levels ( $p<0.001$ ), while vitamin D and calcium concentrations were low ( $p<0.001$ ). FGF-23 concentration was higher in Stage IV than in all other stages. Differences in  $\alpha$ -Klotho levels were not significant between stages. While a moderate positive correlation was determined between FGF-23 level and urea and creatinine concentrations and between urine protein/creatinine ratio, no correlation could be determined between  $\alpha$ -Klotho and other parameters.

**Conclusion:** As a result, the increase in FGF-23 and  $\alpha$ -Klotho levels was shown for the first time in dogs with Leishmaniasis. It was observed that the increases in FGF-23 levels were more pronounced in the later stages of the disease and were consistent with the increase in urea and creatinine concentrations. It was thought that findings could be a source for future diagnostic and therapeutic studies to explain the pathophysiology of kidney disease in Leishmaniasis.

**Keywords:** Dog, FGF-23, Leishmaniasis,  $\alpha$ -Klotho.

# 1. GİRİŞ

Köpeklerde Leishmaniasis; bulaşmasına kum sineklerinin aracılık ettiği *Leishmania infantum* (*L. infantum*) tarafından oluşturulan, zoonoz nitelikte, ülkemizde Ege Bölgesi'nde endemik seyreden, sistemik, kronik bir hastalıktır. Hastalık oluşturduğu diğer bulguların yanında, böbreklerde glomerulonefrit, tubulointersitisiyal nefrit ve amiloidozise neden olabilmektedir. Glomerulonefrit, glomerullerde amastigotlara karşı şekillenen antijen-antikor kompleks birikimi nedeniyle oluşmaktadır. Leishmaniasis tanısı konulduğu anda köpeklerin yaklaşık %50'sinde böbrek hasarına ilgili klinik-patolojik bozuklukların belirlenebileceği ifade edilmektedir. Hastalık ilerledikçe tubulointersitisiyal lezyonların artışı ve azoteminin şekillenmesi Leishmaniasis'de ölümün en önemli nedeni olan kronik böbrek yetmezliğini oluşturabilmektedir. Hastalığın başlangıcında henüz klinik bulgu görülmeyen köpeklerde böbrek hasarının azotemi olmaksızın belirlenerek tedaviye başlanabilmesi, prognozun iyileştirilmesi yönüyle önem arz etmektedir (Solano-Gallego ve diğerleri, 2011; Maia ve Campino, 2018; Roura ve diğerleri, 2020).

Fibroblast Büyüme Faktörü-23 (FGF-23) ve Alfa-Klotho ( $\alpha$ -Klotho), kalsiyum fosfor metabolizmasında 2000'li yıllarda belirlenen rolleri yanında kronik böbrek hastalığının erken biyobelirteçleri olarak görülmektedir. Kronik böbrek hastalığında fonksiyonel nefron sayısının azalmasıyla birlikte kan üre ve kreatinin konsantrasyonlarında artış (azotemi) görülmeden önce, kan FGF-23 düzeyinde artış ve  $\alpha$ -Klotho düzeyinde azalmaların olabileceği belirtilmektedir (Kuro, 2019). FGF-23 ve  $\alpha$ -Klotho düzeylerindeki değişimlerin renal fibrozisi artırabileceği, vazküler kalsifikasyon, endotel disfonksiyonu, immunsupresyon ve artan yangısal süreçlerle ilişkilendirilebileceği ifade edilmektedir (Bar ve diğerleri, 2019). Bu yönleriyle hem biyobelirteç hem de ileride potansiyel tedaviye yönelik madde özelliği taşıdıkları vurgulanmaktadır (Kuro, 2019). Köpeklerde her iki biyobelirtecin de değerlendirildiği çalışma sayısı kısıtlıdır. Leishmaniasis, oluşturduğu ilerleyici hasar yönüyle böbrek hasarının erken biyobelirteçlerini değerlendirmek için köpeklerde uygun bir hastalık modeli oluşturmaktadır (Roura ve diğerleri, 2020).

Bu çalışmada sağlıklı ve Leishmaniasis'in farklı evrelerindeki köpeklerde FGF-23 ve  $\alpha$ -Klotho konsantrasyonlarının durumunun belirlenmesi, hastalığın böbrek fonksiyonu temelinde yapılan evrelendirmesinde parametrelerin değişimlerinin ve kalsiyum-fosfor metabolizmasında

önemi olan diğer metabolitlerle ilişkisinin ortaya konması amaçlandı. Çalışma sonuçlarıyla Leishmaniasis'in farklı evrelerindeki köpeklerde hastalığın tanı, prognoz ve monitörizasyonunda kullanılabilir parametrelere yönelik ön verilerin tanımlanması ile literatüre katkıda bulunulması ve yeni projelere temel oluşturulması hedeflendi.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Leishmaniasis

Leishmaniasis, *Leishmania* protozoonların memeli konakçılarının mononükleer fagosit sistemine etkisi ile oluşan bir hastalık grubudur. *Lutzomyia* (Yeni Dünya) ve *Phlebotomus* (Eski Dünya) cinslerine ait dişi kum sineklerinin aktiviteleri ile bulaşmaktadırlar. Çoğunluğu az gelişmiş ülkeler olmak üzere 5 kıtada en az 98 ülke ve 3 bölgede yaygın olarak gözlenmektedir. Dünyada herhangi bir zaman diliminde yaklaşık 12 milyon kişinin bir *Leishmania* türü ile enfekte olabileceği belirtilmektedir (Alvar ve diğerleri, 2012). İnsanlar dahil olmak üzere yaklaşık 70 memeli türü, dünya çapında farklı *Leishmania* türlerinin omurgalı konakçıları olarak kabul edilmektedir. Bunlardan bazıları doğada parazitin rezervuarıdır (Ribeiro ve diğerleri, 2018). Kemirgenlerde ve köpekgillerde doğal enfeksiyon daha yaygın olmakla birlikte, parazit yaban farelerini, keselileri, kedigilleri ve primatları enfekte edebilmektedir. Bu protozoonlar, kendi kendine iyileşebilen Kutanöz Leishmaniasis'ten ölümcül Viseral Leishmaniasis'e (VL) kadar değişen çok çeşitli klinik formlara neden olmaktadır. Hastalığın bilinen klinik formları arasında, Kala-Azar veya VL, tedavi edilmezse neredeyse her zaman ölümcül olduğu için en şiddetli ve ilerleyici formu oluşturmaktadır (Dumonteil ve diğerleri, 2003).

Köpeklerde Leishmaniasis'in Tunus'ta Nicolle ve Comte (1908) (Nicolle ve Comte, 1908) tarafından keşfedilmesinden bu yana, köpek *Leishmania infantum* (*L. infantum*) ile oluşan VL'nin ana rezervuarı olarak tanımlanmıştır (Ribeiro ve diğerleri, 2013). Bu nedenle köpekler, hastalığın insanlara bulaşabilmesinde son derece önemli rol oynamaktadır. Leishmaniasis köpeklerde Akdeniz ülkeleri ve Ortadoğu ülkelerinde sıklıkla görülmekte hastalığın prevalansının bazı bölgelerde %67'ye ulaşabildiği belirtilmektedir (Solano-Gallego ve diğerleri, 2009). Ülkemizde hastalığın endemik seyrettiği Ege Bölgesindeki köpeklerde yapılan çalışmalar prevalansın %1,6-28 arasında olduğunu göstermektedir (Voyvoda, 2004; Atasoy, 2010; Bakirci ve diğerleri, 2016; Çelik ve diğerleri, 2019).

Belirlenen 800'den fazla kum sineği türü arasında yaklaşık 98 tür, Leishmaniasis'in kanıtlanmış veya şüphelenilen vektörleridir (Maroli, 2013). Diğer birçok vektör kaynaklı hastalıkta olduğu gibi, bulaşma dişilerin yumurta geliştirmesi için ihtiyaç duyduğu kan ile

beslendiği sırada ortaya çıkmaktadır. Literatüre göre, kum sineği enfekte bir konağı ısırduğunda, yuvarlak ve hareketsiz amastigot formları ile enfekte olmuş makrofajları da yutmaktadır. Daha sonra parazitler amastigottan flagellat ve promastigot aşamasına dönüşmektedir. Orta bağırsakta ikili bölünme ile çoğalıp enfekte kum sineği vektörünün ön bağırsağı ve ağız kısımlarına (yutak, sibaryum ve hortum) göç etmektedir. Bu sineklerin kan ile beslendiği yeni konakçılara bulaşarak döngüsü sona ermektedir. Enfeksiyöz promastigot formları, vektörün hortumundan konağın derisine geçiş yaptığında, makrofajlar tarafından fagosite edilmektedirler. Daha sonra, makrofajlarda eşeysiz ve sürekli olarak çoğaldıkları amastigot formuna dönüşmektedirler. Parazitler, çoğunlukla dalak, karaciğer, kemik iliği, lenf düğümü ve diğer dokular olmak üzere birçok organda mononükleer fagositleri istila ederek yayılmaktadırlar (Dantas-Torres, 2007; Gharbi ve diğerleri, 2015; Ayele ve Seyoum, 2016).

Kum sineği varlığının kanıtlanmadığı yerlerde Leishmaniasis olgularının ortaya çıkması nedeniyle diğer bulaşma yolları araştırılmıştır. Köpeklerde Leishmaniasis’de özellikle cinsel yolla ve transplasental (dikey, intrauterin) bulaşmanın olabileceği gösterilmiştir (Svobodova ve diğerleri, 2017). İnsan ve köpeklerde kan transfüzyonu sırasında (Owens ve diğerleri, 2001) veya organ nakli (Ma ve diğerleri, 1979; Antinori ve diğerleri, 2008) ve kontamine iğnelerin paylaşımı (Morillas-Marquez ve diğerleri, 2002) gibi diğer bulaşma biçimleri üzerinde durulmaktadır. Ek olarak, parazitin yaralar veya köpek ısırıkları yoluyla doğrudan köpekten köpeğe bulaşabileceği belirtilmektedir (Karkamo ve diğerleri, 2014; Naucke ve diğerleri, 2016). Keneler veya pireler gibi diğer kanla beslenen eklembacaklıların, bu alternatif vektörlerin varlığı ile arasındaki ilişkiye dayanarak bazen *Leishmania*'yı ilettiğinden şüphelenilmiştir (Paz ve diğerleri, 2010; de Oliveira ve diğerleri, 2015). Bu ektoparazitlerin hastalığın bulaşma döngüsündeki rolü hakkında kesin bir sonuç olmamasına rağmen (Oliveira ve diğerleri, 2015; Baneth, 2014), yine de köpeklerin pire, kene ve sivrisineklere karşı önlenmesi ve tedavi edilmesi tavsiye edilmektedir (Franc ve diğerleri, 2012).

Leishmaniasis, amastigotlar ve/veya amastigotlara yanıt olarak oluşan otoimmünantikorlar ve antijen-antikor kompleks birikimi gibi bağışıklık sistemi kaynaklı mekanizmalar sonucu çeşitli doku ve organlarda yangıya neden olabilmektedir (Solano-Gallego ve diğerleri, 2009). Hastalıkta görülen klinik ya da laboratuvar bulgular bir veya daha fazla mekanizma sonucu ortaya çıkabilmektedir. Köpeklerde enfeksiyonun yol açtığı bulguların nedeni etken ve konağın genetik geçmişi arasındaki karmaşık etkileşimlerin sonucudur (Solano-Gallego ve diğerleri, 2011; Maia ve Campino, 2018). Konakçının yaş, ırk, cinsiyet, eşlik eden enfeksiyonlar, immünolojik ve beslenme durumu gibi çeşitli genetik olmayan

faktörler ve *Leishmania* parazitlerine daha önce maruz kalma durumu, enfeksiyonun seyrini etkileyerek herhangi bir bulgunun oluşmadığı tablodan hastalığın kendine özgü klinik bulgularının geliştiği forma kadar değişen şekilde sonuçlanır (Solano-Gallego ve diğerleri, 2011; Maia ve Campino, 2018; Roura ve diğerleri, 2020). Bu kapsamda inkübasyon süresi 7 aydan 7 yıla kadar değişebilmektedir.

Bazı köpekler, klinik belirtiler ortaya çıkmadan enfeksiyonu yıllarca kontrol edebilir ve hatta bazen hastalar kendiliğinden iyileşebilmektedir. Öte yandan, bazı enfekte köpeklerde uygun yönetim ve tedavi uygulanmadığında hastalık akut şekilde şiddetli hastalığa dönüşebilmekte veya ölüme yol açan ilerleyici bir seyir gösterebilmektedir. Etkilenen köpek popülasyonunun neredeyse %50'si klinik belirtiler göstermediğinden, hastalığın klinik tanısı karmaşıktır. *L. infantum* ile doğal enfekte köpeklerin klinik belirtileri köpekler enfekte olduktan üç ay ile birkaç yıl sonra ortaya çıkabilmektedir (Koutinas ve Koutinas, 2014). Klasik formda, hastalığın en erken ve en yaygın klinik belirtilerinden biri popliteal başta olmak üzere, preskapular ve submaksiller lenf nodlarını etkileyen lenfadenopatidir. Dermatolojik anormallikler genellikle daha sonra ortaya çıkar ve karakterizasyonları ve yayılımları açısından sık ve değişken olabilmektedir (Manzillo ve diğerleri, 2013). Köpeklerin yaklaşık %90'ında deri lezyonları mevcuttur; bununla birlikte, hastalığın diğer belirtilerinin yokluğunda dermatolojik değişiklikler nadirdir. Klasik dermatolojik bozukluklar, lokal veya yaygın alopesili veya alopesisiz kaşıntısız ekfoliyatif dermatiti içermektedirler. Eroziv ülseratif dermatit, nodüler, papüler veya püstüler dermatit; nazal hiperkeratoz, nazal depigmentasyon ve onikogrifoz yaygın görülebilir (Koutinas ve Koutinas, 2014; Roura ve diğerleri, 2013). Diğer belirtiler arasında anoreksi, kronik enterit ve kilo kaybı, splenomegali ve hepatomegali, oküler bozukluklar, kas hipotrofisi olabildiği gibi, artrit ve nörolojik belirtiler gibi olağandışı veya atipik belirtiler de yer alabilmektedir (Giannuzzi ve diğerleri, 2017).

Laboratuvar bulgular; hematolojide non-rejeneratif, normositik, normokromik anemi, trombositopeni veya lökogram değişiklikleriyle karşılaşılmaktadır. Serum biyokimyasal ve idrar analizleri, hastalığın ilerleyen aşamalarında böbrek fonksiyon bozukluğunu (azotemi, azalmış idrar özgül ağırlığı, proteinüri) gösterebilmektedir (Paltrinieri ve diğerleri, 2016). Serum poliklonal  $\alpha$ -  $\beta$ - ve  $\gamma$ -hiperglobulinemi, hiperproteinemi, hipoalbuminemi ve azalmış albümin/globulin oranında düşme gibi protein değişiklikleri gözlemlenebilir (Meléndez-Lazo ve diğerleri, 2018). Karaciğer fonksiyonunu değerlendiren biyokimyasal parametrelerdeki artışlar hastalığın ilerlemesi ile ilişkilidir. Akut faz proteinleri konsantrasyonlarında artış (C-reaktif protein, ferritin, haptoglobin, serum amiloid A) yaygın laboratuvar bulgularındandır (Martinez-

Subiela ve diğeri, 2014; Paltrinieri ve diğeri, 2016; Ceron ve diğeri, 2018). Hastalıklı köpeklerde iskelet kası enzimlerinin (örn., kreatin kinaz, laktat dehidrojenaz) aktivitesinde artış, adenosin deaminaz ve butirilkolinesteraz gibi bazı yangısal belirteçlerin serum aktivitesinde azalma bildirilmiştir (Tonin ve diğeri, 2016). Leptin (Di Loria ve diğeri, 2014), matrix metalloproteinazlar (Marangoni ve diğeri, 2011) ya da paraoksonaz-1 (Martinez-Subiela ve diğeri, 2014) gibi moleküllerin artan ekspresyonu ya da aktivitesi de bildirilmiştir. Leishmaniasis'li köpeklerde serum vitamin D konsantrasyonundaki azalmaların hastalığın ilerleyişiyle ilgisi olduğu gösterilmiştir (Rodriguez-Cortes ve diğeri, 2017).

Çok sayıda asemptomatik köpek olması ve patognomonik klinik belirtilerin olmaması nedeniyle hastalığın tanısında laboratuvar desteği çok önemlidir. Tanı için parazitolojik, immünolojik ve moleküler teknikler kullanılabilir fakat bu testler avantaj ve dezavantajlarına göre yorumlanmalıdır. Parazitolojik tanı, amastigotların kemik iliği, lenf düğümleri ve dalak gibi lenfoid organların yanı sıra karaciğer ve deri örneklerinde tespit edilmeleriyle gerçekleştirilen kesin bir tanı yöntemidir (Maia ve Campino, 2018). Örneklerin sitolojik ve histopatolojik/ immünohistokimyasal tekniklere uygun olarak hazırlanması ve incelenmesi gerekmektedir. Moleküler teknikler de yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. PCR ve qPCR periferik kan, kemik iliği veya lenf düğümleri aspiratı gibi çeşitli biyolojik örnekler üzerinde gerçekleştirilebilir. PCR/qPCR tarafından sağlanan bilgilerin klinikopatolojik ve serolojik değerlendirmelerden elde edilen verilerle birlikte değerlendirilmesi önerilmektedir (Solano-Gallego ve diğeri, 2011). Ayrıca immünofloresan antikor testi (IFAT) ve enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA) gibi kantitatif serolojik teknikler kullanılarak, *Leishmania sp.*'ye karşı spesifik antikorların tespiti yoluyla tanı konulabilir. Bununla birlikte serolojik testler, çapraz reaksiyonlar ve düşük titrelerde yanlış negatif sonuçlara neden olabilmeleri yönüyle dikkatle yorumlanmalıdır (Roura ve diğeri, 2020). Son yıllarda, veteriner kliniklerinde rutin laboratuvar testleri olarak immünokromatografik testler kullanılmaktadır. Bu testlerin gerçekleştirilmesi hızlı ve kolaydır (yaklaşık 15 dakika), sonuçları yorumlamak için eğitimli personel veya özel laboratuvar gerektirmez ve güvenilir duyarlılık ve özgüllük indeksleri sundukları belirtilmektedir. Ancak bu tür hızlı testler de düşük titrelerde yanlış negatif sonuçlara neden olabilmeleri yönüyle dikkatle yorumlanmalıdır (Solano-Gallego ve diğeri, 2011).

Köpeklerde Leishmaniasis, 2011 yılının başına kadar üç temel sınıflandırmayla incelenmiştir. Enfekte ve herhangi bir klinik bulgu göstermeyen hastalar asemptomatik; uyumlu klinik bulgulardan yalnızca birini gösterenler oligosemptomatik; daha fazla klinik bulgu



gösterenler ise polisemptomatik hastalar olarak değerlendirilmiştir (Ciaramella ve diğerleri, 1997; Moreira ve diğerleri, 2007). Etkilenen köpekleri hastalığın şiddetine göre gruplandırarak daha doğru bir tanı, prognoz ve tedavinin oluşturulmasına yönelik farklı araştırma gruplarının önerileri olmakla birlikte günümüzde öne çıkan iki evreleme sistemi bulunmaktadır (Proverbio, 2016). LeishVet grubu, hastalığı şiddetine göre dört evrede [Evre I: hafif hastalık; Evre II: orta derecede hastalık; Evre III: şiddetli hastalık; Evre IV: çok şiddetli hastalık] sınıflandırmaktadır (Tablo 2; Solano-Gallego ve diğerleri, 2011). Bahsedilen evreleme sisteminde klinik, serolojik, hematolojik-biyokimyasal bulgular ve Uluslararası Renal İlgili Derneği (IRIS) ile uyumlu böbrek fonksiyonunun ayrıntılı değerlendirmesi (Tablo 1) temel alınmaktadır. Köpek Leishmaniasis Çalışma Grubu (CLWG) Sistemi ise köpekleri beş evreye ayırmaktadır [Evre A: maruz kalan köpekler; Evre B: enfekte köpekler; Evre C: hasta köpekler (klinik olarak belirgin Leishmaniasis'li köpekler); Evre D: ağır hasta köpekler; Evre E: tedaviye yanıtız veya erken nüks] klinik duruma göre ve serolojik ve parazitolojik (sitoloji, histoloji veya PCR) tanı ve klinikopatolojik anormallikler ile ilişkilendirilmektedir (Roura ve diğerleri, 2013; Paltrinieri ve diğerleri, 2010).

**Tablo 1.** IRIS standartlarına göre köpeklerde kronik böbrek yetmezliğinin sınıflandırılması (IRIS, 2019)

IRIS Evre	Kan kreatinin konsantrasyonu (mg/dL)	SDMA ( $\mu\text{g/dL}$ )	Yorum
1	<1,4	<18	Normal kan kreatinin veya normal veya hafif kan SDMA artışı. Mevcut bazı diğer böbrek anormallikleri (örneğin, tanımlanabilir böbrek dışı bir neden olmaksızın yetersiz idrar konsantrasyon yeteneği, anormal böbrek palpasyonu veya böbrek görüntüleme bulguları, böbrek kaynaklı proteinüri, anormal böbrek biyopsi sonuçları). Kalıcı olarak yükselen kan SDMA konsantrasyonu (>14 $\mu\text{g/dl}$ ) erken KBH tanısı için kullanılabilir.
2	1,4-2,8	18-25	Normal veya hafif derecede artmış kreatinin, hafif renal azotemi. Hafif derecede artmış SDMA. Klinik belirtiler genellikle hafiftir veya yoktur.
3	2,9-5,0	26-38	Orta derecede renal azotemi. Birçok böbrek dışı belirti mevcut olabilir, ancak bunların kapsamı ve şiddeti değişebilir. Belirti yoksa, durum erken Evre 3 olarak kabul edilebilirken, çok sayıda veya belirgin sistemik işaretin varlığı Geç Evre 3 olarak sınıflandırmayı gerektirebilir.
4	>5,0	>38	Artan sistemik klinik belirtiler ve üremik kriz riski

Leishmaniasis'li köpeklerde azotemi ile seyreden böbrek hastalığının prevalansı %5,9 (Meléndez-Lazo ve diğerleri, 2018) ile %38,1 (Koutinas ve diğerleri, 1999) arasında değişirken, patolojik renal proteinüri prevalansının yaklaşık %50 olabileceği ifade edilmektedir (Cortadellas ve diğerleri, 2008). Tanısal görüntüleme, böbrek biyopsisi veya böbreklerin doğrudan görüntülenmesi durumunda prevalansın yükselebileceği bildirilmektedir (Roura ve diğerleri, 2020). Bu doğrultuda veteriner hekimlerin Leishmaniasis'li köpeklerin tümünde böbrek hastalığı olabileceğini göz önünde bulundurmaları gerektiği belirtilmektedir (Roura ve diğerleri, 2020). Leishmaniasis, proteinüriye neden olabilen ve böbrek yetmezliğine ilerleyebilen glomerulonefritin yaygın bir nedenidir (Aresu ve diğerleri, 2013; Koutinas ve Koutinas, 2014). Böbrek yetmezliğine bağlı azotemi, Leishmaniasis'li köpeklerde sıklıkla tanımlanmıştır ve bazı köpekler son aşamada ölümcül olabilen şiddetli böbrek yetmezliği ile tanı alabilmektedir (Ciaramella ve diğerleri, 1997; Koutinas ve diğerleri, 1999; Ribeiro ve diğerleri, 2013; Roura ve diğerleri, 2020). Proteinüri tanı anında yaygın olarak fark edilirken renal azoteminin daha az görülen bir bulgu olduğu bildirilmektedir (Paltrinieri ve diğerleri, 2016; Meléndez-Lazo ve diğerleri, 2018; Roura ve diğerleri, 2020).

Köpeklerde Leishmaniasis ile ilişkili böbrek lezyonları genel olarak kronik interstisyel enflamasyonu (lokal enfeksiyonla ilişkili) ve glomerulonefriti (proteinüri veya nefrotik sendroma yol açan) içermektedir. Membranoproliferatif, membranöz ve mezanjiyoproliferatif glomerulonefrit dahil olmak üzere, interstisyel fibroz, glomerüloskleroz ve son dönem böbrek hastalığına ilerleyen bir dizi glomerüller ve sekonder tübüler lezyon tanınmaktadır. Hastalığındaki glomerüller patolojinin ana nedeninin, glomerüller birimde immün komplekslerin birikmesi olduğu düşünülmektedir; kompleksin boyutu ve yükü (katyonik) durumu şiddetlendirebilir. Membranoproliferatif formda immün kompleksler mezanjiyum içinde ve glomerüller bazal membranın epitelyal veya endotelyal taraflarında veya her ikisinde birikir. Bu, mezanjiyum ve epitelyal ve/veya endotelyal hücrelerin proliferasyonu ile bazal membranın kalınlaşmasına neden olur. Membranöz formda ise bazal membranın epitelyal tarafında immün kompleks birikimi meydana gelir ve hücresel proliferasyon veya enflamasyon olmaksızın bazal membran kalınlaşmasına neden olur. Mezanjiyoproliferatif formda daha büyük bağışıklık kompleksleri mezanjiyum içinde birikerek hücresel proliferasyona ve mezanjiyal matrisin birikmesine yol açar (Aresu ve diğerleri, 2013; Roura ve diğerleri, 2020).

İmmün kompleks hastalığı, kompleman bileşenlerinin tükenmesi ve dolaşımdaki kompleman faktörlerinin (örn., C3 ve C4) düşük konsantrasyonları ile ilişkilidir. Leishmaniasis'li köpeklerin kanında dolaşan bağışıklık kompleksleri tespit edilebilmiştir

(Cacheiro-Llaguno ve diğeri, 2020; Gizzarelli ve diğeri, 2020) ve bir klinik vakada hastalığın tedavisine yardımcı olarak başarılı bir şekilde (Baneth ve diğeri, 2018) hemodiyaliz kullanılmıştır. Glomerüller immünreaktantlar, etkilenen böbreklerde immünofloresan etiketleme ve transmisyon elektron mikroskobu ile de gösterilmiştir (Aresu ve diğeri, 2013). Bu tür glomerüller immün kompleksler, *Leishmania* antijenlerini, antikorları (genellikle IgG veya IgM sınıflarından) ve kompleman moleküllerini (özellikle kompleman yolunun üçüncü bileşeni, C3) içerir (Soares ve diğeri, 2009). İmmünoreaktanlar, böbrek hastalığı olmayan klinik olarak normal köpeklerin glomerüllerinde de bulunabilir ve bazı çalışmalarda kontrol köpekleri Leishmaniasis'li köpeklerle karşılaştırıldığında bu durum söz konusudur (Soares ve diğeri, 2009; Costa ve diğeri, 2010).

## 2.2. Kalsiyum-Fosfor Metabolizması

Kalsiyum ve fosfor; kemik oluşumu, enerji metabolizması, farklı metabolik yollar ve hücre içi sinyalizasyon dahil olmak üzere bir dizi biyolojik sistemde hayati öneme sahiptir. Mineral homeostazı, bağırsak emilimi, kemik akışı ve akışı ve böbrek atılımı arasındaki denge ile sağlanmaktadır. Mineral metabolizmasındaki bozukluklar, çeşitli iskelet, metabolik ve endokrin bozukluklarla ilişkilendirilir. Kalsiyum ve fosfattaki anormallikler, böbrek fonksiyon bozukluğu olan bireylerde yaygın olarak görülür. Yüksek serum fosfat ve kalsiyum x fosfat ürünü, sağlıklı bireylerde olduğu kadar kronik böbrek hastalığı (KBH) olan hastalarda kardiyovasküler morbidite ve mortalite için önemli risk faktörleri olarak tanımlanmaktadır (Dittmer ve diğeri, 2017; Parker ve diğeri, 2017).

Kalsiyum, vücutta en fazla bulunan beşinci element olarak değerlendirilir. Kemik metabolizması ve kasların kasılmasından hücre içi sinyalleme kadar çeşitli biyolojik süreçler için kritik öneme sahiptir. Temel bir elementtir ve sadece diyet kaynakları yoluyla elde edilebilmektedir. Günlük ihtiyaç tür, cinsiyet ve yaşa bağlı değişebilir. Gençlerde kalsiyum dengesi yüksek kemik oluşumuna izin verecek şekilde pozitifken, yaşlılarda genellikle kemik oluşumu ve kütlelerinde azalma ile negatiftir. Kalsiyum homeostazı, bağırsak, kemik, böbrekler ve paratiroid bezleri üzerinde etkili olan faktörler arasındaki karmaşık etkileşim yoluyla düzenlenmektedir. Temel kalsiyum düzenleyici sistemler, G proteinine bağlı parathormon reseptörüne (PTH1R) etki eden parathormon (PTH) ve D vitamini reseptörüne etki eden 1,25 dihidroksivitamin D (1,25(OH)2D)'dir (Olauson, 2013). Serum kalsiyum konsantrasyonunda

azalma, paratiroid bezi kalsiyum algılayıcı reseptörünü hızla etkisiz hale getirerek, paratiroid ana hücrelerinden önceden oluşturulmuş PTH salgılanmasının artmasına neden olur. PTH, renal kalsiyum geri emilimini artırmak için distal tübüler PTH1R üzerinde ve kemik emilimini artırmak için iskelet PTH1R üzerinde etki eden 84 amino asitli bir polipeptittir. Düşük kalsiyum seviyeleri uzun süre devam ederse, PTH mRNA transkripsiyonunda bir artış olur ve nihayetinde paratiroid hücre proliferasyonunda bir artış olur. Buna karşılık, yüksek serum kalsiyumu kalsiyum algılayıcı reseptörünü aktive eder ve PTH sekresyonunda hızlı bir azalmaya yol açar, daha sonra renal kalsiyum kaybının artmasına, kemik rezorpsiyonunun azalmasına ve intestinal kalsiyum absorpsiyonunun azalmasına neden olur. Serum kalsiyumu ve PTH arasındaki ilişki, kalsiyum konsantrasyonundaki nispeten küçük değişikliklerin PTH sekresyonunda büyük tepkiler uyandırdığı sigmoidal bir eğri oluşturur (Olauson, 2013).

D vitamini diyetle alınabilmekte ya da köpek ve kediler hariç olmak üzere bazı türlerde UVB radyasyonuna maruz kaldığında deride sentezlenebilmektedir. Karaciğerde 25 hidroksivitamin D'ye (25(OH)D) 25-hidroksilasyona tabi tutulur ve daha sonra renal 25-dihidroksivitamin D 1-alfa-hidroksilaz tarafından biyolojik olarak aktif form olan 1,25(OH)2D'ye 1-hidroksile edilir. Karmaşık bir geri besleme sisteminde 25-dihidroksivitamin D 1-alfa-hidroksilaz, PTH, hipokalsemi ve hipofosfatemide tarafından indüklenir ve hiperkalsemi-hiperfosfatemide tarafından bastırılır. Paratiroid bezindeki D vitamini reseptörü aktivasyonu, PTH sentezini ve sekresyonunu azaltır, ayrıca hücreleri kalsiyum tarafından inhibisyona daha duyarlı hale getirmek için kalsiyum algılayıcı reseptörünü yukarı regüle eder. Distal tübülde 1,25(OH)2D, çeşitli mekanizmalarla kalsiyum alımını kolaylaştırır (Olauson, 2013; Hardcastle ve Dittmer, 2015).

Fosfor, insanlarda en yaygın altıncı elementtir ve vücut kütlelerinin yaklaşık %1.4'ünü oluşturmaktadır. Neredeyse hiçbir zaman elemental formunda değildir ve vücutta ağırlıklı olarak oksijene fosfat (PO<sup>3-</sup>) olarak bağlıdır. Fosfat, tüm yaşam formları için gereklidir ve adenozin trifosfatın bir parçası olarak enerji metabolizmasında, DNA ve RNA gibi biyolojik moleküllerde ve fosfolipidlerin bir bileşeni olarak hücre zarında çok önemli bir rol oynamaktadır. Fosfatın büyük çoğunluğu (yaklaşık %80) mineralize dokuya, ağırlıklı olarak kemik ve dişlere hidroksiapatit ([Ca]<sub>5</sub>[PO<sub>4</sub>]<sub>3</sub>[OH]) şeklinde bağlanmaktadır. Geri kalanı iskelet kaslarında ve hücre dışı bölmelerde dağıtılmaktadır. Fosfat homeostazı, intestinal absorpsiyon, renal reabsorpsiyon ve iskelet metabolizmasını etkileyen çeşitli faktörler tarafından sağlanan kalsiyuma benzer şekildedir (Hardcastle ve Dittmer, 2015). Fosfatın emilmesi, ince bağırsakta hem pasif difüzyon hem de sodyuma bağlı fosfat taşıyıcı Npt2b

tarafından aktif taşıma yoluyla gerçekleşir. Yüksek diyet fosfat alımı pasif parasetül alımını artırırken, fosfatın aktif taşınması 1,25(OH)<sub>2</sub>D tarafından indüklenir ve enterositlerin luminal tarafında sodyum bağımlı fosfat yardımcı taşıyıcı Npt2b'nin varlığını artırır. Böbrekler, fosfat düzenlemesinde kilit organlardır ve nötr bir dengenin korunmasında fosfatın böbreklerde yeterli düzeyde tutulması esastır. Fosfat glomerülde serbestçe süzülür ve proksimal tübüllerdeki yeniden emilim endokrin düzenlemeye yanıt olarak sağlanır. Fizyolojik koşullar altında, filtrelenen fosfatın yaklaşık %70'i yeniden emilir. Yeniden emilim hızı, düşük fosfat koşulları sırasında artırılabilir ve esas olarak sodyum bağımlı fosfat ortak taşıyıcıları Npt2a ve Npt2c'nin apikal fırça sınırı varlığı ile belirlenir. Bağırsak ve böbreklere ek olarak, kemik fosfat metabolizmasında önemli bir rol oynar. Fosfat, osteoblastlar ve osteositler tarafından matris mineralizasyon sürecinde çok önemli bir bileşendir (Olauson, 2013).

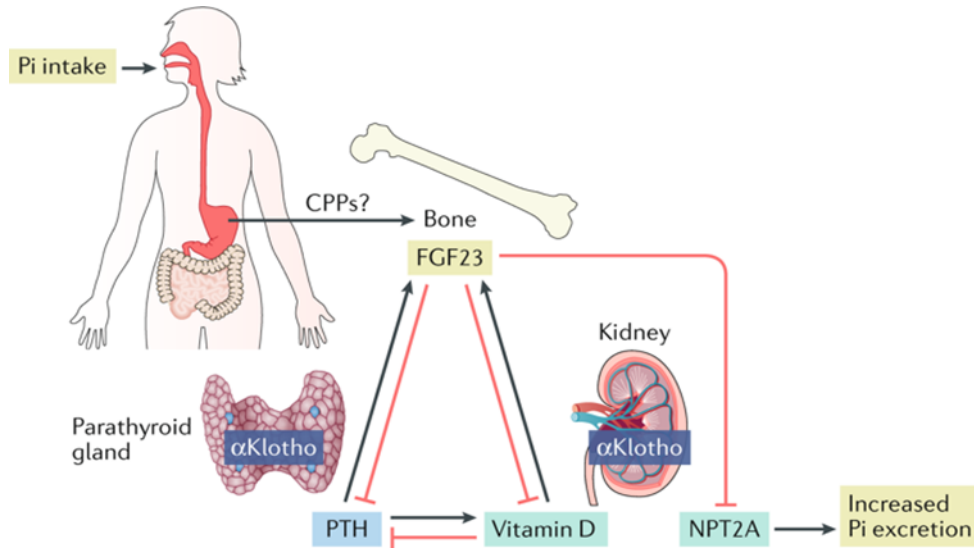
Son yıllarda, FGF-23 ve  $\alpha$ -Klotho'nun dahil olduğu yeni bir endokrin eksenin tanımlanması mineral metabolizmasının anlaşılmasında yeni bir yol açmıştır (Bar ve diğerleri, 2019).

### **2.3. Fibroblast Büyüme Faktörü-23 ve $\alpha$ -Klotho**

Fibroblast büyüme faktörü (FGF) ailesi, farklı görevleri olan 22 üyeden oluşmaktadır. Çoğunluğu parakrin ve/veya otokrin etkili olan FGF'lerden farklı olarak, FGF-19, 21 ve 23 endokrin etkilerinin bulunması nedeni ile endokrin FGF'ler olarak bilinmektedir. Fibroblast Büyüme Faktörü-23 (FGF-23), kalsiyum-fosfor metabolizmasında düzenleyici role sahip protein yapısında bir hormondur. FGF-23, hiperfosfatemiyeye yanıt olarak osteositlerden salgılanmakta; böbreklerden fosfor atılımını artırmakta, 1,25 dihidroksi vitamin D (1,25(OH)<sub>2</sub>D) sentezini ve PTH salgılanmasını baskılamaktadır (Hardcastle ve Dittmer, 2015).

Fibroblast büyüme faktörlerinin hedef dokularda etki gösterebilmeleri için Klotho proteinlerine ihtiyaçları vardır. Klotho proteinleri  $\alpha$ -Klotho,  $\beta$ -Klotho ve  $\gamma$ -Klotho olmak üzere üç farklı transmembran proteininden oluşmaktadır. Her biri, çeşitli FGF'ler için reseptör kompleksleri oluşturmaktadır.  $\alpha$ -Klotho, FGF-23 için zorunlu ko-faktör işlevi gören bir proteindir (Urakawa ve diğerleri, 2006). FGF-23'ün fizyolojik etkileri, ko-faktörü  $\alpha$ -Klotho'nun bulunduğu böbrek, paratiroid bezi, koroid pleksus ve hipofiz bezi üzerinde görülmektedir (Kuro, 2019; Şekil 1).

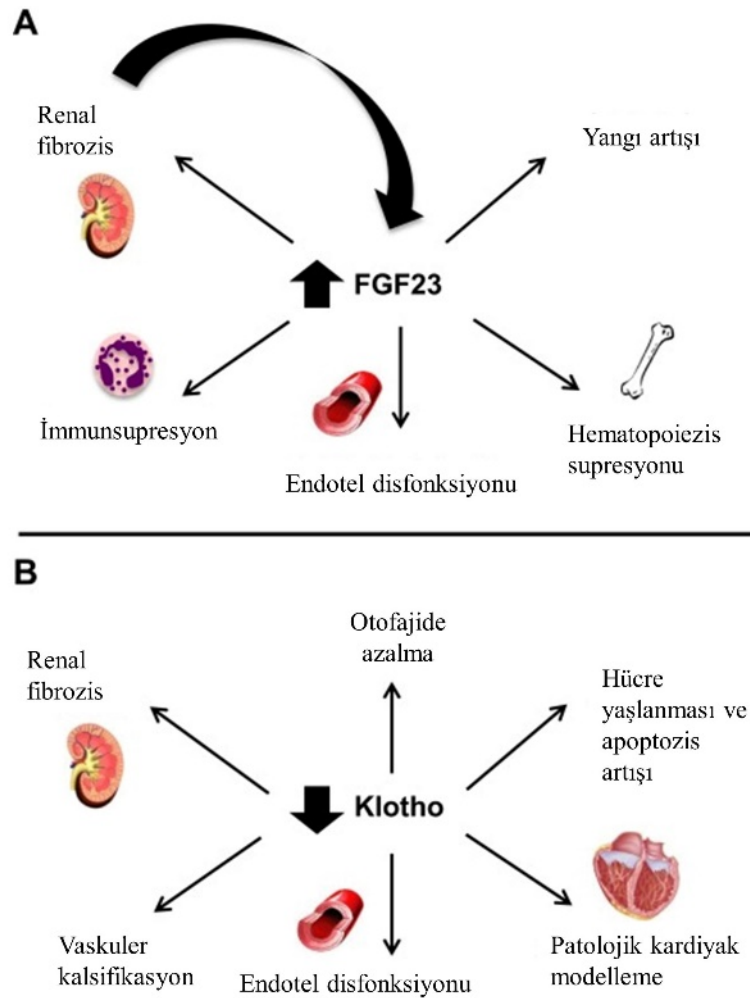
FGF-23 ve  $\alpha$ -Klotho'nun 2000'li yıllarda keşfi sonrası fosfat homeostazının sadece paratiroid bezi ve böbrek tarafından değil, kemik, böbrek ve paratiroid bezi arasındaki karmaşık bir endokrin aks tarafından sürdürüldüğü anlaşılmıştır (Ramon ve diğerleri, 2010). Sağlıklı kişilerde serum fosfat düzeyleri arttığında, FGF-23 ve PTH sekresyonu uyarılmaktadır. Bu iki hormon, renal proksimal tubül hücrelerinde fosfat geri emilimini sağlayan NaPi-2a ve NaPi-2c'nin ekspresyonunu azaltarak fosfatürük etki göstermektedirler. FGF-23'ün, 1,25(OH)2D'nin yapımını baskılayarak bağırsaklardan fosfat emilimini azaltması da fosfat dengesinin korunmasına katkıda bulunmaktadır. PTH, 1 $\alpha$ -hidroksilaz enzimini uyararak 1,25(OH)2D üretimini artırır ve osteositlerde FGF-23 ekspresyonunu uyarır. 1,25(OH)2D, PTH sentezini baskılar ve FGF-23 sekresyonunu uyarır. FGF-23 ise her iki hormonun sentezini de azaltmaktadır (Gattineni ve diğerleri, 2009). FGF-23, 25-hidroksivitamin D (25(OH)D)'yi aktif metaboliti 1,25(OH)2D'ye çeviren 1 $\alpha$  hidroksilaz enzimini baskılamakta ve 1,25(OH)2D'nin inaktif metabolitlere dönüşümünü sağlayan 24-hidroksilaz enzimini uyarır (Saito ve diğerleri, 2003; Bar ve diğerleri, 2019).



**Şekil 1.** Kalsiyum-fosfor dengesinin sağlanmasında görevli bileşenlerin etkileşimleri (Kuro, 2019)

FGF-23 düzeyinin artış gösterdiği durumlar; renal fosfat kaybı, hipofosfatemi ile uyumlu olmayan azalmış 1,25(OH)2D seviyeleri ve osteomalazi ile karakterizedir. FGF-23 düzeyindeki azalmalar ise hiperfosfatemi, 1,25(OH)2D yüksekliği ve yumuşak doku kalsifikasyonlarına neden olabilmektedir (Hardcastle ve Dittmer, 2015; Bar ve diğerleri, 2019).

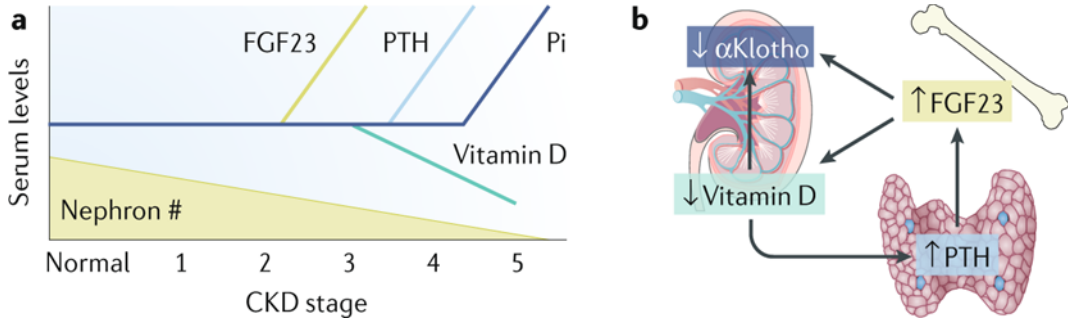
Ko-faktör olan  $\alpha$ -Klotho fosfat homeostazında FGF-23'den bağımsız bir rol de oynamaktadır (Zou ve diğerleri, 2018). Hayvan çalışmaları ve klinik gözlemler  $\alpha$ -Klotho eksikliğinin ciddi hiperfosfatemiye yol açtığını göstermiştir.  $\alpha$ -Klotho'nun orta düzeyde yükselmesi serum fosfat düzeyini azaltır, şiddetli düzeyde yükselince ise hipofosfatemi ve FGF-23 düzeyinde artışı indüklemektedir.  $\alpha$ -Klotho, bağırsak fosfat emilimi ve böbrek tarafından idrar fosfat atılımını PTH, FGF-23 ve D vitamini gibi diğer hormonlarla uyumlu etkileşimde bulunarak dolaşımdaki fosfatı dar bir aralıkta tutmaktadır.  $\alpha$ -Klotho'nun fosfat homeostazının korunmasındaki rolü, Na bağımlı fosfat taşıyıcılarının hedef organlarda doğrudan baskılanmasıyla sağlanmaktadır. Bu nedenle, genetik ve edinilmiş fosfat metabolizma bozuklukları ya da kronik böbrek hastalığı gibi  $\alpha$ -Klotho eksikliği olan durumlarda  $\alpha$ -Klotho'nun sağaltımda kullanımı da gündeme getirilmektedir (Bian ve diğerleri, 2014; Zou ve diğerleri, 2018). FGF-23 ve  $\alpha$ -Klotho düzeylerindeki değişimlerin etkileri Şekil 2'de özetlenmiştir.



Şekil 2. FGF-23 ve  $\alpha$ -Klotho düzeylerindeki değişimlerin etkileri (Bar ve diğerleri, 2019)

## 2.4. Kronik Böbrek Hasarı ile Fibroblast Büyüme Faktörü-23 ve $\alpha$ -Klotho'nun İlişkisi

Kronik böbrek hastalıklı (KBH) insanlarda, serum FGF-23 konsantrasyonundaki artışın üre, kreatinin konsantrasyonlarındaki artış ve diğer mineral bozukluklardan önce şekillendiği belirtilmektedir (Bar ve diğerleri, 2019; Kuro, 2019; Şekil 3). Serum kalsitriol, PTH ve fosfor konsantrasyonlarında değişiklikler KBH'nin sonraki aşamalarında meydana gelmektedir (Silver ve Naveh-Many, 2013). KBH'deki FGF-23 artışının ana tetikleyicisi böbrek klirensindeki azalmaya bağlı fosfat tutulumu olarak bildirilmiştir. KBH sırasında yüksek serum FGF-23 düzeyinin demir eksikliği, yüksek PTH ve hipokalsemi ile de ilişkili olabileceğini belirtmektedir. 2008 yılında gerçekleştirilen bir prospektif çalışma ile hemodiyaliz hastalarında FGF-23 ile mortalite arasında kademeli ilişki belirlenmiştir (Gutierrez ve diğerleri, 2008). Takip eden epidemiyolojik çalışmalarda yüksek FGF-23 düzeylerinin kardiyovasküler morbidite ve mortalite ile KBH ilerleme sürecinde istenmeyen klinik sonuçlarla ilgili olduğu gösterilmiştir (Gutierrez ve diğerleri, 2009; Isakova ve diğerleri, 2011; Arnlov ve diğerleri, 2012)



**Şekil 3.** Kronik böbrek hastalığının farklı evrelerinde gözlenen muhtemel değişiklikler (Kuro, 2019)

Klotho proteini hem endokrin faktör olarak dolaşıma salınabilen çözünebilir formda hem de hücre yüzeyinde membran formunda bulunabilmektedir. Membran formunun temel görevi FGF-23 için ko-faktör olmakla birlikte, çözünebilir Klotho kan, idrar, beyin omurilik sıvısı dahil olmak üzere biyolojik sıvılarda bulunan çok fonksiyonlu bir proteindir. Yaşlanma, enerji metabolizması, anti-oksidasyon, iyon taşınmasının modülasyonu, PTH ve vitamin D3 üretiminin kontrolü ve renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminin antagonizmasında önemli rol almaktadır. Klinik ve temel çalışmalar KBH sürecinde Klotho'nun erken bir biyobelirteç olması yanında, Klotho eksikliğinin vasküler kalsifikasyon, kardiyak hipertrofi ve sekonder



hiperparatiroidizm gibi komplikasyonların gelişmesine kaynaklık edebileceğini göstermektedir. Bu nedenle, Klotho'nun yalnızca bir biyobelirteç olarak değil, KBH için yeni bir terapötik ajan olarak da oldukça umut verici bir aday olduğu belirtilmektedir (Hu ve diğerleri, 2013; Zou ve diğerleri, 2018).

İnsanlarda “kronik böbrek hastalığı-mineral kemik bozukluğu” terimi, düşük vitamin D, yüksek serum fosfat ve PTH düzeyleri ile renal osteodistrofi ve anormal mineral metabolizması ile karakterize edilen tabloyu tanımlamak için kullanılmıştır (Silver ve Naveh-Many, 2013). FGF-23 ve  $\alpha$ -Klotho düzeylerindeki değişikliklerin bu metabolik sonuçlarla ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (Nitta ve diğerleri, 2014; Erben ve Andrukhova, 2017). Bu kapsamda FGF-23 ve  $\alpha$ -Klotho hem duyarlı ve özgül biyobelirteç hem de potansiyel terapötik özellikleriyle öne çıkmaktadır (Hu ve diğerleri, 2010; Panesso ve diğerleri, 2014; Hu ve diğerleri, 2017).

Leishmaniasis, köpeklerde özellikle böbreklerde oluşturduğu ilerleyici hasar yönüyle renal biyobelirteçleri değerlendirmek için uygun bir hastalık modeli oluşturmaktadır (Paltrinieri ve diğerleri, 2016). Leishmaniasis’li köpeklerde renal hasarın erken göstergesi olabilecek biyobelirteçler araştırılmaya halen devam edilmektedir. Bu kapsamda serum ve/veya idrarda sistatin C, simetrik dimetil arjinin (SDMA), ferritin, GGT, C-reaktif protein, clusterin, adinopektin gibi biyobelirteçler değerlendirilmiştir (García-Martínez ve diğerleri, 2012; Tvarijonaviciute ve diğerleri, 2012; Martinez-Subiela ve diğerleri, 2013; García-Martínez ve diğerleri, 2015; Pardo-Marin ve diğerleri, 2016, Torrent ve diğerleri, 2018, Giapitzoglou ve diğerleri, 2020).

Leishmaniasis’te renal hasarın düzeyi ve ilerleyişinin izlenmesi tanı, prognozun belirlenmesi ve tedavinin takibi için oldukça önem arz etmektedir. Klasik parametreler olarak bilinen üre ve kreatinin düzeyleri ancak renal fonksiyonların %75’i bozulduğunda birlikte yükselmekte olup renal yetmezliğinin erken tanısında istenen duyarlılığı göstermemektedir (Garcia-Martinez ve diğerleri, 2015). Böbrek hasarı ya da fonksiyonunun değerlendirilmesinde üre ve kreatinin yerine geçebilecek biyobelirteçlerin yaklaşık 15 senedir arandığı ve halen istenilen ölçütlerde parametrelerin sağlanamadığı belirtilmektedir (Coca, 2019). Ayrıca üre ve kreatinin konsantrasyonları stres, açlık, beslenme düzensizlikleri, hafif dehidrasyon, vücut kondüsyonu, ateşli hastalıklar gibi renal fonksiyonla ilgisi olmayan durumlardan etkilenebilmektedir. Bu nedenle Leishmaniasis’de sağaltımın planlanması ve prognozun tahminlenmesi için yeni renal biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır.

FGF-23 ve  $\alpha$ -Klotho, kalsiyum-fosfor metabolizmasında 2000’li yıllarda belirlenen rolleri yanında kronik renal hasarın erken biyobelirteçleri olarak tanımlanmaktadır (Panesso ve

diğerleri, 2014; Hu ve diğerleri, 2017; Kuro ve diğerleri, 2019). Kronik böbrek hastalığında işlev gören nefron sayısının azalmasıyla birlikte kan üre ve kreatinin konsantrasyonlarında artış (azotemi) görülmeden önce, FGF-23 düzeyinde artış ve  $\alpha$ -Klotho düzeyinde azalmaların olabileceği belirtilmektedir (Kuro ve diğerleri, 2019). FGF-23 ve  $\alpha$ -Klotho düzeylerindeki değişimlerin renal fibrozisi artırabileceği, vasküler kalsifikasyon, endotel disfonksiyonu, immunosupresyon ve artan yangısal süreçlerle ilişkilendirilebileceği ifade edilmektedir (Bar ve diğerleri, 2019; Şekil 2).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu araştırma, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu'nun 21.01.2021 tarih ve 64583101/2021/001 sayılı iznine dayanarak gerçekleştirildi. Tez çalışmasında değerlendirilen tüm köpeklerin hasta sahipleri bilgilendirildi ve yazılı onayları alındı.

#### 3.1. Hayvan Materyali

Çalışmada 22 sağlıklı, 52 Leishmaniasis'li olmak üzere her iki cinsiyetten, farklı yaş ve orta büyüklükteki ırklardan toplam 74 (n=74) köpek değerlendirildi. Leishmaniasis'li köpekler klinik ve laboratuvar bulgular belirlenmesinden sonra Leishvet çalışma grubunun önerileri doğrultusunda (Tablo 2) hastalığın şiddetine göre dört farklı evrede alt gruplara ayrıldı.

##### 3.1.1. Sağlıklı Köpekler

Sağlıklı kontrol grubu, Leishmaniasis'li köpeklerin belirlenmesi sonrası benzer yaş ve cinsiyeti sağlayabilecek nitelikte oluşturuldu. Bu amaçla Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi İç Hastalıkları Küçük Hayvan Kliniği'ne aşılama veya sağlık kontrolü amacıyla getirilen ya da fakülte personeli/öğrencilerinin sahip olduğu, klinik ve laboratuvar (hematolojik, biyokimyasal, Snap 4Dx plus, Snap *Leishmania*) değerlendirilmelerinde herhangi bir olumsuzluk belirlenmeyen, her iki cinsiyetten, orta büyüklükteki ırkta, hasta gruba benzer yaş aralığındaki, vücut kondisyonu normal olan köpekler seçildi.

##### 3.1.2. Leishmaniasis'li Köpekler

*Leishmania infantum*'la doğal enfekte köpekler, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Küçük Hayvan Kliniği'ne Leishmaniasis ile uyumlu klinik bulgulardan (hipotrikozis, perioküler alopesi, deri lezyonları, kilo kaybı, onikogripozis, lenfadenopati) bir ya da birkaçını gösteren olgulardan seçildi. Klinik bulgular

temelinde Leishmaniasis şüpheli tanısı konulan köpeklerde kan örneğinde hızlı ELISA prensibiyle çalışan test kiti (Snap *Leishmania*, Idexx, USA) pozitifliği değerlendirildi, serum örneklerinden gerçekleştirilen IFAT testi ile tanı kesinleştirildi. Serolojik değerlendirmede Anti-*Leishmania* antikor titresi, serum örneklerinde IFAT yöntemi ile Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji AD’de belirlendi.

Çalışmaya dahil edilen köpekler, “LeishVet Çalışma Grubu”nun önerileri doğrultusunda (Tablo 2; Solano-Gallego ve diğerleri, 2011) serolojik, klinik ve laboratuvar bulgular dikkate alınarak dört farklı klinik evreden birinde değerlendirildi.

**Tablo 2.** Köpeklerde Leishmaniasis’in Leishvet grubu tarafından önerilen evrelendirmesi (Solano-Gallego ve diğerleri, 2011)

Klinik Evre	Seroloji	Klinik Görünüm	Laboratuvar bulguları
<b>Evre I</b> <b>Hafif</b> <b>Şiddetli</b>	Negatif veya düşük antikor titresi	Periferik lenfadenopati, papüller dermatitis	<b>Normal renal profil; kreatinin &lt;1.4mg/dl; non-proteinürik-İdrar Protein/Kreatinin oranı &lt;0.5</b>
<b>Evre II</b> <b>Orta</b> <b>Şiddetli</b>	Düşük veya orta antikor titresi	Evre I + eksfoliyatif dermatit/onikogripoz, ülserasyonlar, iştah ve kilo kaybı, ateş, epistaksis	Hafif düzeyde non–rejeneratif anemi, hipergamaglobulinemi, hypoalbuminemi <b>Normal renal profil; kreatinin &lt;1.4 mg/dl; non-proteinürik- İdrar Protein/Kreatinin oranı &lt;0.5 ya da kreatinin&lt;1.4 mg/dl; İdrar Protein/Kreatinin oranı=0.5-1</b>
<b>Evre III</b> <b>Şiddetli</b>	Orta veya yüksek antikor titresi	Evre II + vaskulitis, artrit, uveitis ve glomerulonefrit gibi immün kompleks lezyonlar	Evre II’ye ilaveten, IRIS I. derece kronik böbrek yetmezliği= İdrar Protein/Kreatinin oranı >1 ya da IRIS II. derece kronik böbrek yetmezliği= <b>kreatinin: 1,4–2.8 mg/dl</b>
<b>Evre IV</b> <b>Çok</b> <b>Şiddetli</b>	Yüksek antikor titresi	Evre II + pulmoner tromboembolizm, nefrotik sendrom, böbrek hastalıklarının son evreleri	Evre II’ye ilaveten IRIS III. derece kronik böbrek yetmezliği; kreatinin 2.8–5 mg/dl ya da IRIS IV. derece kronik böbrek yetmezliği; <b>kreatinin &gt;5mg/dl</b> , İdrar Protein/Kreatinin oranı >5

Daha önce Leishmaniasis’e yönelik bir tedavi uygulanmış, akut ya da kronik renal yetmezlik tanısı almış, idrar yolu taşı öyküsü bulunan, son bir ay içerisinde anestezi ilaç veya operasyon uygulanmış, diüretik veya nefrotoksik ilaç kullanımı olan ya da doğal nedenlerle sürekli ilaç kullanımı belirtilen olgular çalışmaya alınmadı. *L. infantum* ile enfekte köpekler vektörlerle nakledilen *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrellia burgdorferi* ve

*Dirofilaria immitis* ile ko-enfekte olup olmadıkları hızlı test kiti (SNAP 4Dx plus, Idexx, USA) ile araştırıldı ve yalnızca *L. infantum* ile mono-enfekte köpekler çalışmaya dahil edildi.

Yangısal yanıtta etki edebilecek belirgin diğer farklı sistemik enfeksiyon, idrar yolu enfeksiyon bulgusu, metabolik hastalık (Diabetes mellitus, Hipotiroidizm, Cushing Hastalığı) şüphesi olan ya da neoplazi ve travmalı köpekler çalışmaya dahil edilmedi. Bu konudaki değerlendirme İç Hastalıkları Öğretim Üyeleri tarafından yapıldı.

Yeterli numune (idrara ya da kan) alınamayan veya alınan örneklerde analitik hatalara neden olabilecek (hemoliz, lipemi vd) sorunları olan hasta köpekler çalışmadan çıkarıldı.

## **3.2. Laboratuvar Analizler**

### **3.2.1. Örneklemeler, Örneklerin Saklanması ve Analizler**

Çalışmaya dahil edilen köpeklerden tek sefer örnekleme gerçekleştirildi. Kan örnekleri gıda alımına ilişkin değişikliklerin azaltılması için en az 8 saatlik açlık sonrası *Vena cephalica antebrachii*'den antikoagülanlı (heparin) ve antikoagülanlı tüplere toplamda 10 ml alındı. Tüplere alınan kan örneklerinden santrifüj sonrası plazma ve serumlar elde edildi, en az üçer adet 0,5 ml'lik porsiyonlara bölünerek analiz süresine kadar -20 °C (serum) ve -80 °C'de (plazma/serum) saklandı. İdrar örnekleri hasta sahiplerinin bilgilendirilmesi sonrası köpekleri dolaştırmaları esnasında hasta sahiplerine verilecek idrar toplama kaplarına gönüllü idrar numunesi olarak ya da kataterizasyonla elde edildi. Örneklerin alınması ve kataterizasyon hastane işleyişi kapsamındaki rutin protokol çerçevesinde sorumlu Veteriner Hekimler tarafından gerçekleştirildi.

Araştırmada değerlendirilen laboratuvar parametreler, ölçüm amaçları ve yöntemleri Tablo 3'te; kullanılan gereçler ise Tablo 4'te özetlendi. Hastalıkta sıklıkla gözlenen anemi, trombositopeni ve lökopeni gibi hematolojik bulguların değerlendirilebilmesi için tam kan sayımları [total lökosit (WBC), eritrosit (RBC) ve trombosit sayıları (PLT) ile hematokrit değeri (HCT), ortalama eritrosit hacmi (MCV) ve ortalama eritrosit hemoglobini konsantrasyonu (MCHC)] otomatik tam kan sayım cihazında (Abacus VET5, Diatron, Macaristan) örnek alımı sonrası 2 saat içinde gerçekleştirildi.

Leishmaniasis'in evrelemesine ilişkin biyokimyasal analizler kapsamında serum total protein, albümin, üre ve kreatinin konsantrasyonu ölçümü gerçekleştirildi. İdrar örneklerinde

total protein ve kreatinin konsantrasyonları ölçülerek, idrar protein/kreatinin oranı hesaplandı. Böbrek fonksiyonu ile olan yakın ilişkileri gözlemlenerek kalsiyum-fosfor metabolizmasını değerlendirme amacıyla serum kalsiyum, fosfor, PTH, vitamin-D düzeyleri belirlendi. Rutin biyokimyasal parametreler (üre, kreatinin, alkalen fosfataz, alanin ve aspartat aminotransferaz, total protein, albümin, kalsiyum, fosfor) ticari test kitleri (Randox, Amerika Birleşik Devletleri) ile otoanalizörde (Rx Monaco, Randox, Amerika Birleşik Devletleri) ölçüldü.

### **3.2.1.1. FGF-23 Analizi**

Plazma Fibroblast Büyüme Faktörü-23 (FGF-23) konsantrasyonları köpek spesifik ELISA test kiti (Canine Fibroblast Growth Factor-23 (FGF-23) ELISA Kit, Katalog no: MBS932371, Mybiosource, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak aşağıda belirtilen prensibe göre ölçüldü.

FGF-23 ELISA kitinde, poliklonal bir anti-FGF-23 antikoru ve bir FGF-23-HRP konjugatı kullanan rekabetçi enzim immünoanaliz tekniği uygulanmaktadır. Numune ve tampon, önceden kaplanmış plakada FGF-23-HRP konjugatı ile bir saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sonra kuyucuklar boşaltıldı ve beş kez yıkandı. Kuyucuklar daha sonra HRP enzimi için bir substrat ile inkübe edildi. Enzim-substrat reaksiyonunun ürünü mavi renkli bir kompleks oluşturdu. Son olarak, reaksiyonu durdurmak için bir durdurma solüsyonu eklendi. Renk yoğunluğu, bir mikropilaya okuyucuda 450 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Numunelerden alınan FGF-23 ve FGF-23-HRP konjugatı, anti-FGF-23 antikor bağlama bölgesi için rekabet ettiğinden, rengin yoğunluğu FGF-23 konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Rengin yoğunluğunu standartların konsantrasyonu ile ilişkilendiren standart bir eğri çizildi ve her numunedeki FGF-23 konsantrasyonu bu eğriden belirlendi. Sonuçlar pg/mL olarak elde edildi.

### 3.2.1.2. Alfa-Klotho ( $\alpha$ -Klotho) Analizi

Serum  $\alpha$ -Klotho konsantrasyonları köpek spesifik ELISA test kitleri (Canine Soluble Alpha-Klotho (SAKL) ELISA Kit, Katalog no: MBS9359084, Mybiosource, Amerika Birleşik Devletleri) ile aşağıda belirtilen prensibe göre ölçüldü.

Test prosedürlerine başlamadan önce mikroplakanın, tüm reaktiflerin ve numunelerin oda sıcaklığına (18°C-25°C) gelmesi beklendi. Standart kuyucuklara 50  $\mu$ l Standart (S1, S2, S3, S4, S5, S6) ve her numune kuyucuğuna 50  $\mu$ l numune eklendi. Üzerine 100  $\mu$ l HRP-Konjugat Reaktifi eklendi. Plaka kapatma jelatini ile örtüldü ve 60 dakika 37°C'de inkübe edildi. Tüm kuyular (tüm Blank kuyucukları dahil) dört kez yıkandı. Her kuyucuğa 50  $\mu$ l kromojen solüsyon A eklendi. Her kuyuya 50  $\mu$ l kromojen solüsyon B eklendi. Yavaşça karıştırıldı ve plaka 37°C'de 15 dakika inkübe edildi. Her kuyucuğa 50  $\mu$ l durdurma solüsyonu eklendi. Durdurma solüsyonu eklendikten sonra 15 dakika içinde bir ELISA okuyucu kullanılarak 450 nm'de absorban değeri okutuldu Sonuçlar pg/mL olarak elde edildi.

### 3.2.1.3. 25(OH)D3 Vitamini Analizi

Serum 25-hidroksi vitamin D3 konsantrasyonu köpek spesifik ELISA test kiti (Canine 25-hydroxy vitamin D ELISA Kit, Katalog no: EA0026Ca, BT LAB, Çin) ile aşağıda belirtilen prensibe göre ölçüldü.

Önceden kaplanmış plakaya önce örnekler, sonra biyotinlenmiş antijen eklendi. Örneklerdeki antijenler, yakalama antikoruna bağlanmak ve inkübe etmek için biyotinlenmiş antijen ile rekabet eder. Bir yıkama adımı sırasında bağlanmamış antijen uzaklaştırıldı. Daha sonra avidin-HRP eklenerek inkübe edildi. Bağlanmamış avidin-HRP, yıkama ile uzaklaştırıldı. Ardından TMB Substrata eklendi. Reaksiyon asidik durdurma solüsyonu eklenerek durduruldu ve 450 nm'de ölçülebilen sarı renge dönüştü. Oluşan rengin yoğunluğu, numunedeki 25-hidroksi vitamin D3 konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Örnekteki 25-hidroksi vitamin D3 konsantrasyonu, numunelerin optik dansitesi standart eğriyle karşılaştırılarak belirlendi. Sonuçlar  $\mu$ g/L olarak elde edildi.

### 3.2.1.4. Parathormon (PTH) Analizi

Serum PTH düzeyi köpek spesifik ELISA test kiti (Canine Parathyroid Hormone (PTH) ELISA Kit, Katalog no: E0320Ca, BT LAB, Çin) ile aşağıda belirtilen prensibe göre ölçüldü.

Kullanılan mikropılaka köpek PTH antikoru ile önceden kaplanmıştı. Numunede bulunan PTH kuyucuklar üzerinde kaplanmış antikorlara bağlandı. Daha sonra biyotinlenmiş köpek PTH Antikoru eklendi ve numunedeki PTH'ye bağlanması sağlandı. Daha sonra Streptavidin-HRP eklendi ve Biotinylated PTH antikoruna bağlandı. İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP bir yıkama adımı sırasında yıkanarak uzaklaştırıldı. Daha sonra substrat solüsyonu eklendi ve köpek PTH miktarıyla orantılı olarak renk gelişimi izlendi. Reaksiyon, asidik durdurma solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırıldı ve absorbans değeri 450'nm dalga boyunda ölçüldü. Sonuçlar ng/L olarak elde edildi.

**Tablo 3.** Değerlendirilen laboratuvar parametreler, ölçüm amaçları ve yöntemleri

Parametre	Ölçüm amacı	Yöntemi
Tam kan sayımı	Hematolojik değişikliklerin belirlenmesi	Coulter methodu
Alkalin fosfataz, alanin ve aspartat aminotransferaz, total protein, albümin	Karaciğer fonksiyonlarının değerlendirilmesi	Kolorimetrik veya enzimatik yöntem
Üre, kreatinin, idrar dansitesi, idrar protein/kreatinin	Böbrek fonksiyonunun değerlendirilmesi	Kolorimetrik yöntem, refraktometre
Kalsiyum, fosfor, vitamin D, PTH	Kalsiyum-fosfor metabolizmasının değerlendirilmesi	Kolorimetrik yöntem, ELISA
FGF-23, $\alpha$ -Klotho	Leishmaniasis'li köpeklerde ilişkili parametrelerle birlikte değerlendirilme	ELISA

Hematolojik ve biyokimyasal analizlerin gerçekleştirilebilmesi için kullanılan cihazlar ve kullanım amacı Tablo 4'te sunulmuştur.



**Tablo 4.** Kullanılan cihazlar ve kullanım amacı

Cihaz Türü, Modeli	Kullanım Amacı
Kan sayım cihazı – Abacus VET5	Tam kan sayımı
Biyokimya otoanalizörü – Randox, Rx Monaco	Biyokimyasal parametrelerin analizi
Santrifüj- Nüve	Serum ve plazma örneklerinin eldesi
Buzdolabı – Bosch (-20 °C)	Malzemelerin, kitlerin ve örneklerin saklanması
ELISA Reader- Thermo Scientific, Multiska GO	ELISA prensibiyle değerlendirilecek parametrelerin analizi
Buzdolabı- Nuair Mu9668E (-80 °C)	Serum ve plazma örneklerinin saklanması

### 3.3. Verilerin Sunulması ve İstatistiksel Değerlendirme

Sayısal verilerin dağılımı Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Verilerin dağılımına göre aritmetik ortalamaları ve standart hataları ya da ortanca değerleri ile minimal ve maksimal değerleri belirlenerek tablolarda sunuldu. Dağılımı normal olan parametrelerin (albumin, kalsiyum ve hemoglobin konsantrasyonları, RBC sayısı ve HCT değer) iki grup karşılaştırmasında Student T testi, ikiden fazla grubun karşılaştırmasında ise tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Gruplar arası farklılıklar Tukey testi ile belirlendi. Dağılımı normal olmayan parametrelere ait verilerin karşılaştırılmasında nonparametrik testler kullanıldı. Sağlıklı ve Leishmaniasis’li köpek grupları Mann-Whitney U testi, sağlıklı ve evrelere göre gruplandırılan Leishmaniasis’li köpeklere ait veriler ise Kruskal-Wallis testi ve ikiden fazla grup arasındaki farklılıkların belirlenmesi için eşleştirilmiş karşılaştırma yöntemi kullanılarak analiz edildi. Evreler arası değerlendirme öncesi IFAT değerlerine logaritmik transformasyon uygulandı ve karşılaştırmalar geometrik ortalama üzerinden gerçekleştirildi. Leishmaniasis’li köpeklere FGF-23 ve  $\alpha$ -Klotho ile kalsiyum-fosfor metabolizması ve böbrek fonksiyonuna ilgili parametreler arasındaki korelasyon değerlendirilmesi Spearman testi kullanılarak yapıldı. Korelasyon katsayısı (rho) yüksek (>60), orta (= 30-60) ve zayıf (<30) olarak değerlendirildi (Kogika ve diğerleri, 2014). Analizler istatistiksel bir yazılım paketi (SPSS 22.0, SPSS Inc., Chicago, ABD) ile gerçekleştirildi. Tüm değerlendirmelerde olasılık değerleri  $p < 0.05$  anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

Çalışmada elde edilen hematolojik ve biyokimyasal bulgular Leishmaniasis’li köpeklerde genel ve evrelere göre gruplandırılmış olarak sağlıklı köpek verileriyle karşılaştırılarak alt bölüm 4.1 ve 4.2’de değerlendirildi. Sağlıklı kontrol grubu ve Leishmaniasis’li köpeklerin yaş, ırk, cinsiyet ve vücut ağırlığı bilgileri ve klinik bulguları aşağıda özetlendi.

Araştırmanın sağlıklı kontrol grubunu Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi’ne aşılama veya sağlık kontrolü amacıyla getirilen ya da fakülte personelinin sahip olduğu, klinik ve laboratuvar değerlendirmelerinde (hematolojik, biyokimyasal, Snap *Leishmania*, Snap 4Dx plus) herhangi bir anormallik saptanmayan, her iki cinsiyetten, 1-9 yaş aralığındaki, orta büyüklükteki ırkta, vücut kondisyon skoru normal köpeklerden (n=22) oluşturuldu (Tablo 5). Çalışmaya dahil edilen Leishmaniasis’li köpekler (n=52) klinik ve laboratuvar bulgular temelinde Evre I (n=16), Evre II (n=14), Evre III (n=9) ve Evre IV (n=13) olarak gruplandırıldı.

Leishmaniasis’li ve sağlıklı köpeklerde yaş, ırk, cinsiyet ve vücut ağırlığı bulguları Tablo 5’te özetlendi. Gruplar arasında yaş, cinsiyet ve vücut ağırlığı farklılıklarının anlamlı olmadığı belirlendi. Sağlıklı grupta 12 melez, 4 Golden retriever, 4 Labrador Retriever ve 2 Boxer ırkı, Leishmaniasis’li grupta ise 37 melez, 3 Golden Retriever, 3 Labrador Retriever, 3 Kangal Çoban Köpeği, 2 Rottweiler, 2 Terrier, ve 2 Alman Çoban Köpeği ırkı köpek değerlendirildi.

**Tablo 5.** Sağlıklı ve Leishmaniasis’li köpeklerde demografik bulgular

Parametre	Sağlıklı (n=22)	Leishmaniasis’li (n=52)	P
Yaş (yıl)	5,75 ± 1,97 (2-8)	4,70 ± 2 (1-9)	0.236
İrk (n)	Melez (n=12) Golden retriever (n=4) Labrador retriever (n=4) Boxer (n=2)	Melez (n=37) Golden retriever (n=3) Labrador retriever (n=3) Kangal çoban köpeği (n=3) Alman çoban köpeği (n=2) Rottweiler (n=2) Terrier (n=2)	
Cinsiyet (erkek/dişi)	11/11	27/25	
Vücut ağırlığı (kg)	20 ± 4,9 (14-35)	22 ± 8 (16-40)	0.327

Sağlıklı kontrol grubunu oluşturan köpekler önceden belirlenen klinik ve laboratuvar parametrelere göre değerlendirilerek belirlendi. Sağlıklı kontrol grubunda herhangi bir klinik bulgu saptanmadı. Leishmaniasis'li köpeklerde lenfadenomegali (n=41), eksfoliyatif dermatitis (n=20), iştahsızlık (n=19), kilo kaybı (n=16), onikogripozis (n=13), alopesi (n=10), konjunktivitis (n=9), nazal hiperkeratosis (n=7), kulak ucu dermatozu (n=6), uveitis (n=6) ve epistaksis (n=3) en sık karşılaşılan bulgular olarak öne çıktı. Çalışma kapsamında değerlendirilen bazı olgulara ilgili görseller Şekil 4, 5 ve 6'da sunulmuştur.



**Şekil 4.** Çalışmada değerlendirilen Evre II Leishmaniasis'li bir olgu. Periokuler alopesi, kepeklenme ve dermatolojik lezyonlar.



**Şekil 5.** Çalışmada değerlendirilen Evre III Leishmaniasis’li bir olgu. Kulak ucu dermatozu başta olmak üzere dermatolojik lezyonlar.



**Şekil 6.** Çalışmada değerlendirilen Evre IV Leishmaniasis’li bir olgu. Yaygın dermatolojik bulgular, onikogripozis, oküler bulgular.



#### 4.1. Leishmaniasis'li Köpeklerde Serolojik, Hematolojik ve Biyokimyasal Bulgular

Hastalığın evresi dikkate alınmadan toplam 52 Leishmaniasis'li köpeğe ilgili belirlenen klinik, serolojik ve hematolojik bulgular sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılarak Tablo 6'da özetlendi.

Leishmaniasis'li köpeklerde IFAT değerlerinin 1/64 ile 1/2048 arasında değiştiği belirlendi. Hematolojik değerlendirmede WBC sayısı, MCV ve MCHC değerleri arasında farklılık belirlenmezken, RBC ( $p<0.05$ ) ve PLT ( $p<0.01$ ) sayıları ile HCT değer ( $p<0.001$ ) Leishmaniasis'li köpeklerde düşük bulundu.

**Tablo 6.** Sağlıklı ve Leishmaniasis'li köpeklerde belirlenen IFAT değeri ve hematolojik bulgular

Parametre	Sağlıklı (n=22)	Leishmaniasis (n=52)	P
IFAT	-	128 (1/64-1/2048)	<b>0.000</b>
WBC ( $\times 10^9/L$ )	11,33 (3,37-14,7)	11,35 (2,7-31,4)	0.683
RBC ( $\times 10^{12}/L$ )	6,22 $\pm$ 0,7 (4,9-8,3)	5,47 $\pm$ 1,6 (2,4-10,7)	<b>0.041</b>
HCT (%)	42,1 $\pm$ 3,6 (36,6-47,6)	36,1 $\pm$ 10,4 (17,2-57,7)	<b>0.001</b>
MCV (fL)	68 (63-80)	66,5 (38,9-85,1)	0.182
MCHC (g/dL)	31,7 (30,7-34)	32,5 (26,2-38)	0.460
PLT ( $\times 10^9/L$ )	282 (208-522)	207 (4-729)	<b>0.006</b>

Sağlıklı ve Leishmaniasis’li köpeklerde belirlenen rutin biyokimyasal parametreler Tablo 7’de sunuldu. Yapılan değerlendirmede; gruplar arasında serum ALT ve ALP enzim aktivitelerinde istatistiksel önemli farklılık belirlenmedi. Serum total protein ( $p<0.001$ ), üre ( $p<0.01$ ), kreatinin ( $p<0.05$ ) konsantrasyonları ile idrar protein/kreatinin oranı ( $p<0.001$ ) Leishmaniasis’li köpeklerde yüksek bulunurken, serum albumin konsantrasyonu ( $p<0.01$ ) ve serum AST enzim aktivitesi ( $p<0.05$ ) düşük saptandı.

**Tablo 7.** Sağlıklı ve Leishmaniasis’li köpeklerde belirlenen rutin biyokimyasal parametreler

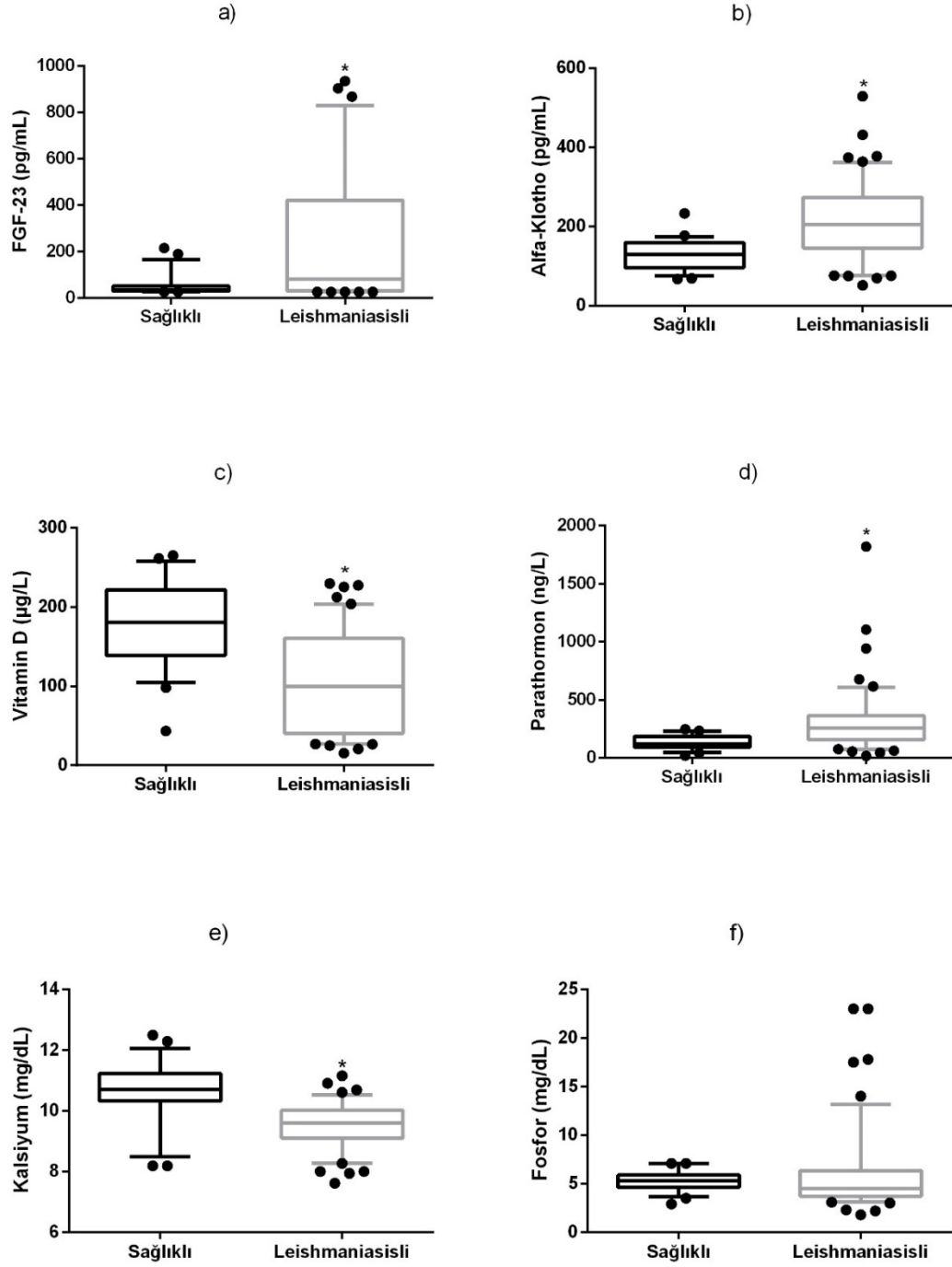
Parametre	Sağlıklı (n=22)	Leishmaniasis (n=52)	P
<b>Total Protein (g/dL)</b>	5,89 (4,8-7,0)	7,61 (4,3-14,1)	<b>0.000</b>
<b>Albumin (g/dL)</b>	2,6 ± 0,1 (2,3-2,9)	2,2 ± 0,5 (1,1-3,3)	<b>0.003</b>
<b>ALT (U/L)</b>	38,2 (23-53)	42 (9-220)	0.117
<b>AST (U/L)</b>	45 (18-98)	30,5 (9-267)	<b>0.036</b>
<b>ALP (U/L)</b>	77,5 (33-99)	51 (17-264)	0.061
<b>Üre (mg/dL)</b>	33,5 (14-42)	40,5 (14-724)	<b>0.002</b>
<b>Kreatinin (mg/dL)</b>	0,97 (0,3-1,3)	1,16 (0,2-16)	<b>0.034</b>
<b>İdrar Protein/Kreatinin</b>	0,13 (0,07-0,33)	0,83 (0,07-10)	<b>0.000</b>

Sağlıklı ve Leishmaniasis’li köpeklerde FGF-23 ve  $\alpha$ -Klotho ile kalsiyum-fosfor metabolizmasına ilgili parametreler Tablo 8 ve Şekil 7’de sunuldu.

Gruplar arası değerlendirmede fosfor konsantrasyonları arasında istatistiksel farklılık bulunmadı. Leishmaniasis’li köpeklerde FGF-23 ( $p<0.05$ ),  $\alpha$ -Klotho ve PTH değerleri yüksek ( $p<0.001$ ) belirlenirken, D vitamini ve kalsiyum konsantrasyonları ise düşük ( $p<0.001$ ) bulundu.

**Tablo 8.** Sağlıklı ve Leishmaniasis’li köpeklerde plazma FGF-23 ve serum  $\alpha$ -Klotho konsantrasyonları ile kalsiyum-fosfor metabolizması parametreleri

Parametre	Sağlıklı (n=22)	Leishmaniasis (n=52)	P
<b>FGF-23 (pg/mL)</b>	34,3 (26,2-215,5)	81,9 (26,2-1056)	<b>0.017</b>
<b><math>\alpha</math>-Klotho (pg/mL)</b>	129 (67,2-232,6)	204,7 (51,2-528,8)	<b>0.000</b>
<b>D vitamini (<math>\mu</math>g/L)</b>	180,5 (43,4-261,4)	99,3 (15,3-380,8)	<b>0.000</b>
<b>Parathormon (ng/mL)</b>	122,2 (19,3-247,1)	258 (17,8-1821)	<b>0.000</b>
<b>Kalsiyum (mg/dL)</b>	10,6 $\pm$ 1 (8,1-12,5)	9,5 $\pm$ 0,7 (7,6-11,1)	<b>0.000</b>
<b>Fosfor (mg/dL)</b>	5,3 (2,9-7,1)	4,5 (1,8-23)	0.221



**Şekil 7.** Sağlıklı ve Leishmaniasis'li köpeklerde FGF23 (a),  $\alpha$ -Klotho (b), Vitamin D (c), Parathormon (d), Kalsiyum (e) ve Fosfor (f) düzeyleri. Kutular yüzde 25 ve 75'lik dilimi, bıyıklar yüzde 10 ve 90'lık dilimi gösterir. Her bir kutunun içindeki çizgi medyanı gösterir. Noktalar dilim dışında kalan sonuçları temsil eder. \* Sağlıklı gruba göre farklılıklar istatistiksel anlamlıdır.



Leishmaniasis'li köpeklerde (n=52) FGF-23 ve  $\alpha$ -Klotho ile kalsiyum-fosfor metabolizmasına ve böbrek fonksiyonuna ilgili parametreler arasındaki korelasyonlar Tablo 9'de sunuldu. FGF-23 düzeyi ile üre, kreatinin konsantrasyonları arasında zayıf, idrar protein/kreatinin oranı arasında ise orta pozitif yönde korelasyon belirlenirken,  $\alpha$ -Klotho ile diğer parametreler arasında anlamlı bir ilişki belirlenemedi. Bu parametreler dışında serum kalsiyum ile kreatinin ve idrar protein/kreatinin; fosfor ile üre, kreatinin ve idrar protein/kreatinin; üre ile kreatinin ve idrar protein/kreatinin arasında pozitif yönlü farklı güçte ilişkiler saptandı.

**Tablo 9.** Leishmaniasis'li köpeklerde FGF-23 ve  $\alpha$ -Klotho ile kalsiyum-fosfor metabolizması ve böbrek fonksiyonuna ilgili parametreler arasındaki korelasyonlar (n=52)

		FGF 23	$\alpha$ klotho	D vitamini	PTH	Kalsiyum	Fosfor	Üre	Kreatinin	İdrar Protein/ Kreatinin
FGF-23	rho	1	,110	,059	-,256	,264	,233	,300	,285	,397
	P		,436	,679	,072	,058	,097	,031	,041	,004
$\alpha$ -Klotho	rho	,110	1	-,054	-,156	-,008	,162	-,156	-,149	-,082
	P	,436		,706	,280	,954	,253	,269	,293	,562
D vitamini	rho	,059	-,054	1	-,152	-,050	,081	,049	,029	-,056
	P	,679	,706		,291	,726	,570	,731	,841	,691
PTH	rho	-,256	-,156	-,152	1	-,114	,130	-,028	-,107	-,027
	P	,072	,280	,291		,431	,367	,847	,461	,851
Kalsiyum	rho	,264	-,008	-,050	-,114	1	-,007	,267	,346	,273
	P	,058	,954	,726	,431		,962	,056	,012	,050
Fosfor	rho	,233	,162	,081	,130	-,007	1	,478	,444	,455
	P	,097	,253	,570	,367	,962		,000	,001	,001
Üre	rho	,300	-,156	,049	-,028	,267	,478	1	,833	,605
	P	,031	,269	,731	,847	,056	,000		,000	,000
Kreatinin	rho	,278	-,149	,029	-,107	,346	,444	,833	1	,780
	P	,046	,293	,841	,461	,012	,001	,000		,000
İdrar Protein/ Kreatinin	rho	,374	-,082	-,056	-,027	,273	,455	,605	,780	1
	P	,006	,562	,691	,851	,050	,001	,000	,000	

#### 4.2. Leishmaniasis'li Köpeklerde Evrelere Göre Hematolojik ve Biyokimyasal Bulgular

Leishmaniasis'li köpekler klinik, serolojik ve laboratuvar bulgular temelinde Leishvet grubunun belirlediği kriterler (Tablo 2) dikkate alınarak Evre I (n=16), Evre II (n=14), Evre III (n=9), Evre IV (n=13) olarak alt gruplara ayrıldı. Hastalığın farklı evrelerindeki köpeklerde belirlenen IFAT değeri ile sağlıklı köpeklerin hematolojik bulguları karşılaştırılması Tablo 10'da özetlendi.

Serolojik değerlendirmede sağlıklı gruptaki köpeklerde 1/64 üzerinde antikor titresine rastlanılmadı. Evre I ve III grubundaki olguların IFAT değerleri 1/64 ile 1/256 arasında iken, Evre II gruptaki olguların IFAT değerleri 1/64-1/512 arasında değişim göstermekteydi. Evre IV gruptaki olguların IFAT değerleri 1/128 ile 1/2048 arasında titrasyona sahipti. Leishmaniasis'in farklı evrelerine göre gruplandırılan köpeklerde IFAT değerleri Evre IV grubu köpeklerde diğer gruplara göre yüksek bulundu ( $p<0.001$ ).

Hematolojik değerlendirmede; WBC sayısı ile MCV ve MCHC değerlerinde gruplar arası farklılıklar önem göstermezken RBC ( $p<0.01$ ) ve PLT ( $p<0.05$ ) sayıları ile HCT değerinde ( $p<0.001$ ) farklılıklar anlamlı bulundu. Gruplar içindeki karşılaştırmada; Evre IV grubunun RBC sayısı sağlıklı, Evre I ve III grubu köpeklere göre, HCT değeri ise sağlıklı ile Evre I grubu köpeklere göre düşük saptandı. PLT sayısı Evre I ve IV grubu köpeklerde sağlıklı gruba göre düşük bulundu.

**Tablo 10.** Sağlıklı ve Leishmaniasis'li köpeklerde evrelere göre IFAT değeri ve hematolojik bulgular

Parametre	Sağlıklı (n=22)	Evre I (n=16)	Evre II (n=14)	Evre III (n=9)	Evre IV (n=13)	P
IFAT	- <sup>a</sup>	1/64 <sup>b</sup> (1/64-1/256)	1/96 <sup>b</sup> (1/64-1/512)	1/64 <sup>b</sup> (1/64-1/256)	1/512 <sup>c</sup> (1/128-1/2048)	<b>0.000</b>
WBC (x10 <sup>9</sup> /L)	11,33 (3,37-14,72)	9,54 (4,3-20,3)	11,28 (4,1-31,4)	12,37 (6,5-26,9)	12,38 (2,7-21)	0.707
RBC (x10 <sup>12</sup> /L)	6,2 ± 0,7 <sup>a</sup> (4,9-8,3)	6,1 ± 1,2 <sup>ab</sup> (3,5-7,8)	5,4 ± 1,2 <sup>ac</sup> (3,3-7,8)	5,9 ± 2,2 <sup>ab</sup> (3,6-10,7)	4,3 ± 1,3 <sup>c</sup> (2,4-6,7)	<b>0.002</b>
HCT (%)	42,1 ± 3,6 <sup>a</sup> (36-47)	40,4 ± 8,6 <sup>a</sup> (23-57)	37,1 ± 10 <sup>ab</sup> (23-54)	37,8 ± 11 <sup>ab</sup> (23-55)	28,7 ± 9,1 <sup>b</sup> (17-44)	<b>0.000</b>
MCV (fL)	68 (63,8-80,0)	66,0 (59-78)	67,5 (52-79)	68 (59-78)	66 (38-85)	0.573
MCHC (g/dL)	31,7 (30,7-34)	31,8 (28,2-37)	33,1 (27,6-38)	32,5 (26,2-34)	33,1 (27,2-34,3)	0.624
PLT (x10 <sup>9</sup> /L)	282 <sup>a</sup> (208-522)	185 <sup>b</sup> (46-613)	244,5 <sup>ab</sup> (48-677)	345 <sup>ab</sup> (27-729)	210 <sup>b</sup> (4-304)	<b>0.024</b>

\*Aynı satırda farklı harfle gösterilen değerler arasındaki fark anlamlıdır.

Hastalığın evrelerine göre dört grupta (Evre I-IV) değerlendirilen köpeklerde bazı rutin biyokimyasal parametrelere ilgili bulgular, sağlıklı köpeklerden elde edilen veriler ile karşılaştırılarak Tablo 11'da özetlendi.

Yapılan değerlendirmede; serum ALT ve ALP aktivitelerinde gruplar arasında istatistiksel önemli farklılık belirlenmedi ( $p>0.05$ ). Sağlıklı kontrol gruba göre; serum total protein konsantrasyonunun tüm evrelerde yüksek olduğu saptandı. Serum albumin konsantrasyonu Evre I grubu köpeklerde sağlıklı gruba göre düşük belirlendi. Sağlıklı ve Evre

IV gruplarına göre; serum AST aktivitesi Evre II köpeklerde düşük, diğer gruplarla farklılıkların anlamlı olmadığı belirlendi.

İdrar protein/kreatinin oranının sağlıklı gruba göre tüm gruplarda artış gösterdiği bulunurken, Evre IV grubunun Evre I grubuna göre yüksek olduğu görüldü. Serum üre ve kreatinin konsantrasyonlarının Evre III ve IV gruplarında sağlıklı gruba göre yüksek olduğu belirlendi. Buna ek olarak Evre IV grubundaki köpeklerin serum üre ve kreatinin konsantrasyonları tüm gruplara göre yüksekti.

**Tablo 11.** Sağlıklı ve Leishmaniasis’li köpeklerde evrelere göre rutin biyokimyasal parametreler

Parametre	Sağlıklı (n=22)	Evre I (n=16)	Evre II (n=14)	Evre III (n=9)	Evre IV (n=13)	P
<b>Total Protein (g/dL)</b>	5,89 <sup>a</sup> (4,8-7,0)	6,92 <sup>b</sup> (5,1-10)	8,43 <sup>b</sup> (6,6-11,4)	7,63 <sup>b</sup> (6,4-14,1)	6,77 <sup>b</sup> (4,2-11,4)	<b>0.000</b>
<b>Albumin (g/dL)</b>	2,6 ± 0,1 <sup>a</sup> (2,3-2,9)	2,2 ± 0,5 <sup>b</sup> (1,1-3,3)	2,2 ± 0,5 <sup>a,b</sup> (1,5-3,3)	2,4 ± 0,6 <sup>ab</sup> (1,5-3,2)	2,2 ± 0,3 <sup>ab</sup> (1,5-2,7)	<b>0.025</b>
<b>ALT (U/L)</b>	38,2 (23-53)	33 (13-109)	35 (9-220)	42 (18-77)	60 (22-174)	0.062
<b>AST (U/L)</b>	45 <sup>a</sup> (18-98)	27,5 <sup>ab</sup> (13-189)	27 <sup>b</sup> (11-85)	47 <sup>ab</sup> (12-103)	49 <sup>a</sup> (9-267)	<b>0.026</b>
<b>ALP (U/L)</b>	77,5 (33-99)	57,5 (17-185)	48 (18-120)	35 (17-214)	61 (20-264)	0.160
<b>Üre (mg/dL)</b>	33,5 <sup>a</sup> (14-42)	32,5 <sup>ab</sup> (14-73)	36,5 <sup>ab</sup> (22-67)	68 <sup>b</sup> (22-480)	400 <sup>c</sup> (118-724)	<b>0.000</b>
<b>Kreatinin (mg/dL)</b>	0,97 <sup>a</sup> (0,3-1,3)	0,84 <sup>a</sup> (0,4-1,1)	1,16 <sup>ab</sup> (0,2-1,3)	1,48 <sup>b</sup> (0,6-2,4)	6,37 <sup>c</sup> (3-16)	<b>0.000</b>
<b>İdrar Protein/ Kreatinin</b>	0,13 <sup>a</sup> (0,07-0,3)	0,10 <sup>a</sup> (0,07-0,3)	0,67 <sup>b</sup> (0,5-2)	3 <sup>c</sup> (2-6)	6 <sup>c</sup> (3-10)	<b>0.000</b>

\*Aynı satırda farklı harfle gösterilen değerler arasındaki fark anlamlıdır.

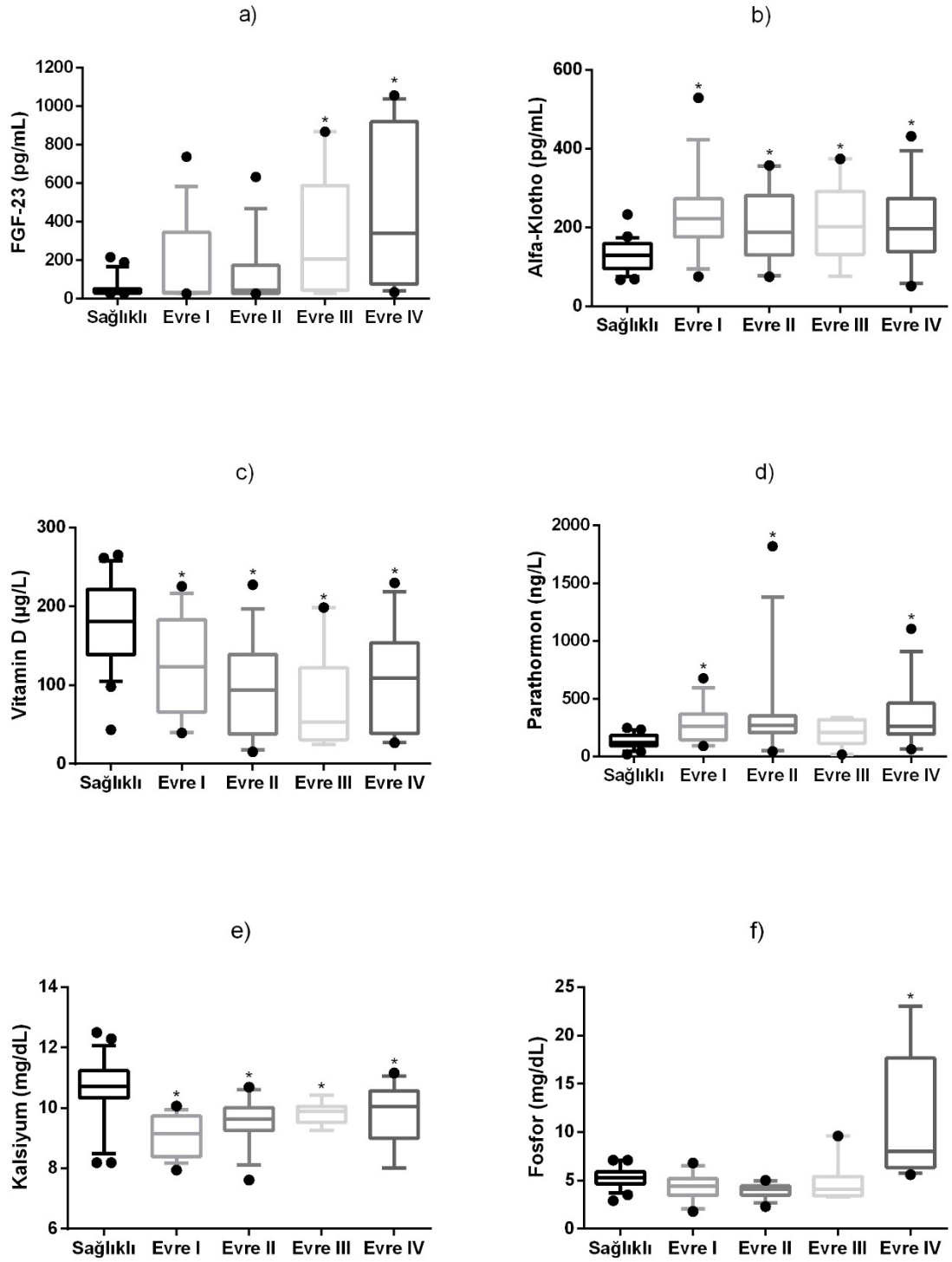
Sağlıklı ve evrelere göre gruplandırılan Leishmaniasis’li köpeklerde plazma FGF-23 ve serum  $\alpha$ -Klotho ile kalsiyum-fosfor metabolizmasına ilgili parametreler Tablo 12 ve Şekil 8’de sunuldu. Gruplar arası değerlendirmede; tüm parametrelerdeki farklılıkların istatistiksel önemli olduğu görüldü. Sağlıklı gruba karşılaştırıldığında; plazma FGF-23 konsantrasyonları tüm evrelerde sağlıklı gruba göre yüksek ortanca değerlere sahip olmakla birlikte farklılıklar Evre III ( $p<0.05$ ) ve Evre IV ( $p<0.001$ ) gruplarında istatistiksel anlamlı bulundu (Şekil 8a). Evreler arasındaki değerlendirmede ise Evre IV grubunda Evre I ve II gruplarına göre yüksekti ( $p<0.05$ ).  $\alpha$ -Klotho ve PTH düzeyleri tüm evrelerde sağlıklı gruba göre yüksek saptanırken (Şekil 8b,d), evreler arasındaki farklılıkların istatistiksel anlam ifade etmediği tespit edildi. Hastalığın tüm evrelerinde vitamin D ve kalsiyum konsantrasyonları sağlıklı gruba göre düşük belirlendi (Şekil 8c,e). Evreler arasındaki farklar ise istatistiksel anlamlı bulunmadı. Fosfor

konsantrasyonu Evre IV grubu köpeklerde diğer evrelere ve sağlıklı gruptaki köpeklere göre yüksekti (Şekil 8f).

**Tablo 12.** Sağlıklı ve Leishmaniasis'li köpeklerde evrelere göre plazma FGF-23 ve serum  $\alpha$ -Klotho değerleri ile kalsiyum-fosfor metabolizması parametreleri

Parametre	Sağlıklı (n=22)	Evre I (n=16)	Evre II (n=14)	Evre III (n=9)	Evre IV (n=13)	P
<b>FGF-23 (pg/mL)</b>	34,32 <sup>a</sup> (26-215)	32,15 <sup>ab</sup> (26-737)	44 <sup>ab</sup> (26-632)	205 <sup>bc</sup> (26-867)	341 <sup>c</sup> (33-1056)	<b>0.002</b>
<b><math>\alpha</math>-Klotho (pg/mL)</b>	129 <sup>a</sup> (67,2-232,6)	222 <sup>b</sup> (75-528)	187 <sup>b</sup> (74-357)	201 <sup>b</sup> (75-373)	197 <sup>b</sup> (51-431)	<b>0.002</b>
<b>D vitamini (<math>\mu</math>g/L)</b>	180 <sup>a</sup> (43,4-261,4)	122 <sup>b</sup> (39-225)	93 <sup>b</sup> (15-227)	53 <sup>b</sup> (24-198)	108 <sup>b</sup> (26-229)	<b>0.000</b>
<b>Parathormon (ng/mL)</b>	122,2 <sup>a</sup> (19,3-247,1)	262 <sup>b</sup> (91-677)	271 <sup>b</sup> (46-1821)	207 <sup>ab</sup> (17-335)	262 <sup>b</sup> (62-1106)	<b>0.002</b>
<b>Fosfor (mg/dL)</b>	5,3 <sup>a</sup> (2,9-7,1)	4,4 <sup>a</sup> (1,8-6,8)	4,10 <sup>a</sup> (2,3-5)	4,10 <sup>a</sup> (3,3-9,6)	8 <sup>b</sup> (5,6-23)	<b>0.000</b>
<b>Kalsiyum (mg/dL)</b>	10,6 $\pm$ 1 <sup>a</sup> (8,1-12,5)	9,1 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup> (7,9-10)	9,5 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup> (7,6-10,6)	9,8 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup> (9,2-10,4)	9,7 $\pm$ 1 <sup>b</sup> (8-11,1)	<b>0.000</b>

\* Aynı satırda farklı harfle gösterilen değerler arasındaki fark anlamlıdır.



**Şekil 8.** Sağlıklı ve evrelere göre Leishmaniasis’li köpeklerde FGF23 (a),  $\alpha$ -klotho (b), Vitamin D (c), Parathormon (d), Kalsiyum (e) ve Fosfor (f) düzeyleri. Kutular yüzde 25 ve 75’lik dilimi, bıyıklar yüzde 10 ve 90’lık dilimi gösterir. Her bir kutunun içindeki çizgi medyanı gösterir. Noktalar dilim dışında kalan sonuçları temsil eder. \* Sağlıklı gruba göre farklılıklar istatistiksel anlamlıdır.

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada sağlıklı ve Leishmaniasis'li köpeklerde plazma FGF-23 ve serum  $\alpha$ -Klotho konsantrasyonlarının belirlenmesi, hastalığın böbrek fonksiyonu temelinde yapılan evrelendirmesinde parametrelerin değişimlerinin ve kalsiyum-fosfor metabolizmasında önemi olan diğer metabolitlerle ilişkisinin ortaya konması amaçlandı. Çalışma sonuçlarıyla Leishmaniasis'in farklı evrelerindeki köpeklerde hastalığın tanı, prognoz, monitörizasyonunda kullanılabilecek parametrelere yönelik ön verilerin tanımlanması ile literatüre katkıda bulunulması ve yeni projelere temel oluşturulması hedeflendi. Çalışmada sağlıklı köpeklere göre; Leishmaniasis'li köpeklerde plazma FGF-23 ( $p<0.05$ ) ile serum  $\alpha$ -Klotho ve PTH değerleri yüksek ( $p<0.001$ ) belirlenirken, D vitamini ve kalsiyum konsantrasyonları ise düşük ( $p<0.001$ ) bulundu. Evreler arası değerlendirmede FGF-23 konsantrasyonu Evre IV'de diğer tüm evrelerden yüksekti.  $\alpha$ -Klotho düzeyindeki farklılıklar ise evreler arasında anlamlı değildi. FGF-23 düzeyi ile üre, kreatinin konsantrasyonları (zayıf) ve idrar protein/kreatinin oranı (orta) arasında pozitif yönde korelasyon belirlenirken,  $\alpha$ -Klotho ile diğer parametreler arasında anlamlı bir ilişki belirlenemedi.

Leishmaniasis'de amastigot ve/veya organizmanın etkene bağışıklık yanıtı ile devreye giren otoimmünantikorlar, immün-kompleks birikimi gibi bağışıklık sistemi aracılı mekanizmalarla çeşitli doku ve organlarda granülamatöz tipte yangı oluşturabilmektedir (Solano-Gallego ve diğerleri, 2009). Oluşan klinik ya da laboratuvar bulgular her hastada farklı olabilmekte, bir veya daha fazla mekanizmanın işlemesiyle ortaya çıkabilmektedir (Koutinas ve diğerleri, 1999; Koutinas ve Koutinas, 2014). Hastalığın kronik seyri nedeniyle klinik bulguların oluşmasının bazı olgularda üç aydan yedi yıla kadar uzayabildiği ifade edilmektedir. Lenfadenopati, kaşeksi, letarji, ateş ve burun kanaması gibi genel bulgular; ekfoliyatif dermatit, nazal hiperkeratoz, alopesi, kepeklenme, onikogripoz gibi dermatolojik bulgular; uveit ve konjunktivit gibi oküler bulgular hastalığın klinik yansımada sık görülebilmektedir. Laboratuvar değerlendirmede ise hafif non-rejeneratif anemi ve trombositopeni gibi hematolojik; azotemi, albümin seviyesinde azalma ve globülin seviyesinde artış ile karakterize total proteinemi öne çıkmaktadır (Solano-Gallego ve diğerleri, 2009). Çalışmaya dahil edilen 52 Leishmaniasis'li köpekte lenfadenomegali ( $n=41$ ), ekfoliyatif dermatitis ( $n=20$ ), iştahsızlık ( $n=19$ ), kilo kaybı ( $n=16$ ), onikogripozis ( $n=13$ ), alopesi ( $n=10$ ), konjunktivitis ( $n=9$ ), nazal hiperkeratoz ( $n=7$ ), kulak ucu dermatozu ( $n=6$ ), uveitis ( $n=6$ ) ve epistaksis ( $n=3$ ) en sık

karşılaşılan bulgular olarak öne çıktı (Şekil 4, 5, 6). Sağlıklı (n=22) gruba göre; Leishmaniasis'li (n=52) grupta RBC ve PLT sayıları, HCT değer ve serum albümin konsantrasyonu düşük; serum total protein, üre, kreatinin konsantrasyonları ile idrar protein/kreatinin oranı yüksek bulundu (Tablo 6 ve 7). Bu değişikliklerin, hastalığın temel klinik ve laboratuvar bulgularıyla uyumlu olduğu görüldü (Solana-Gallego ve diğerleri, 2009).

Klinik Leishmaniasis'li köpekler yanında, asemptomatik enfekte hayvanlar da olabildiği için daha doğru bir tanı, prognoz ve tedavinin oluşturulmasına yönelik etkilenen köpeklerin hastalığın şiddetine göre evrenmesi önerilmektedir. Bu araştırma kapsamında değerlendirilen hasta köpekler Leishvet Çalışma Grubunun önerileri doğrultusunda serolojik, klinik ve laboratuvar bulguları dikkate alınarak Evre I (n=16), Evre II (n=14), Evre III (n=9) ve Evre IV (n=13) olmak üzere dört farklı grupta değerlendirildi (Solano-Gallego ve diğerleri, 2011).

Evre I ve III grubundaki olguların IFAT değerleri 1/64 ile 1/256 arasında iken, Evre II gruptaki olguların IFAT değerleri 1/64-1/512 arasında değişim belirlendi. Evre IV grubundaki olguların IFAT değerleri 1/128 ile 1/2048 arasındaydı (Tablo 6). Evrelere göre gruplandırılan Leishmaniasis'li köpeklerde IFAT değerleri Evre IV grubu köpeklerde diğer gruplara göre yüksek bulundu ( $p<0.001$ ). Özellikle Evre IV'deki belirgin yükselme, hastalığın klinik-patolojik bulguları şiddetlendikçe IFAT değerlerinin artış gösterdiğini belirten bir diğer çalışmayla uyumlu bulundu (Proverbio ve diğerleri, 2014).

Klinik Leishmaniasis'li köpeklerde, kronik yangısal hastalığın tipik özelliği olan hafif-orta derecede normositik ve normokromik rejeneratif olmayan anemi en yaygın hematolojik anormalliktir (Paltrinieri ve diğerleri, 2016). Bu durum eritroid kemik iliği kompartmanındaki bozukluklara bağlı olarak azalmış eritropoez veya kronik böbrek yetmezliğine bağlı olarak azalmış eritropoietin üretimi ile ilişkilendirilmektedir (Maia ve Campino, 2018). Bu çalışmada hematolojik değerlendirmede Evre IV grubunun RBC sayısı sağlıklı, Evre I ve III grubu köpeklere göre, HCT değeri ise sağlıklı ile Evre I grubu köpeklere göre düşük saptandı (Tablo 6). Evre IV grubundaki HCT değer ve RBC sayısındaki belirgin azalmanın başta kronik böbrek yetmezliği ve kronik yangı sonucu ortaya çıkan anemi ile ilişkili olabileceği düşünüldü.

Serum poliklonal  $\alpha$ -  $\beta$ - ve  $\gamma$ -hiperglobulinemi, hiperproteinemi, hipoalbüminemi ve albümin/globulin (A/G) oranında azalma gibi protein değişiklikleri, hastalığın ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir (Ciaramella ve diğerleri, 1997; Koutinas ve diğerleri, 1999; Meléndez-Lazo ve diğerleri, 2018). Hipoalbüminemi ve hiperproteinemi hastalığın negatif prognoz belirteçleri olarak ifade edilmektedir (Geisweid ve diğerleri, 2012; Paltrinieri ve diğerleri, 2016). Bu

araştırmada sağlıklı gruba göre serum total protein konsantrasyonu tüm evrelerde yüksek, albumin konsantrasyonu Evre I, II ve IV grubu köpeklerde düşük belirlenirken (Tablo 7) evreler arası değerlendirmedeki farklılıklar anlamlı bulunmadı.

Bu alışmada, Leishvet evreleme sistemi (Solana-Gallego ve diğerleri, 2009) ve literatüre (Paltrinieri ve diğerleri, 2016) uygun olarak I. ve II. evrede üre ve kreatinin konsantrasyonları referans aralıktta bulunurken, Evre III'de IRIS standartlarına göre (Tablo 1) 1. derece ya da 2. derece böbrek yetmezliği ve Evre IV'de IRIS 3. derece ya da 4. derece böbrek yetmezliği bulguları saptandı (Tablo 7). Sağlıklı gruba göre idrar protein/kreatinin oranının tüm gruplarda artış gösterdiği bulunurken, Evre IV grubunda Evre I grubundan yüksek görüldü. Üre ve kreatinin konsantrasyonlarının Evre III ve IV gruplarında sağlıklı gruba göre yüksek olduğu belirlendi. Buna ek olarak Evre IV grubundaki köpeklerin serum üre ve kreatinin konsantrasyonları tüm gruplara göre yüksek bulundu.

Leishmaniasis glomerulonefrit, tubulointersitisiyal nefrit ve amiloidoz sonucu böbrek hastalığına neden olabilmektedir. Glomerulonefrit, glomerullerde amastigotlara karşı şekillenen immunkompleks (antijen-antikor) birikimi nedeniyle oluşmaktadır. Leishmaniasis tanısı konulduğu anda köpeklerin yaklaşık %50'sinde böbrek hastalığına yönelik klinik-patolojik bozuklukların belirlenebileceği ifade edilmektedir. Hastalık ilerledikçe tubulointersitisiyel lezyonların artışı ve azoteminin şekillenmesi Leishmaniasis'de ölümün en önemli nedeni olan son aşama böbrek yetmezliğini oluşturabilmektedir (Roura ve diğerleri, 2020). Klasik parametreler olarak bilinen serum üre ve kreatinin konsantrasyonları ancak böbrek fonksiyonları %75'i bozulduğunda birlikte yükselmekte ve böbrek yetmezliğinin erken tanısında istenen duyarlılığı göstermemektedir (Garcia-Martinez ve diğerleri, 2015). Böbrek hasarı ya da fonksiyonunun değerlendirmesinde üre ve kreatinin yerine geçebilecek biyobelirteçlerin yaklaşık 15 senedir arandığı ve halen istenilen ölçütlerde parametrelerin sağlanamadığı belirtilmektedir (Coca, 2019). Her parametre avantajları yanında dezavantajlar getirmektedir. Ayrıca re ve kreatinin konsantrasyonları stres, açlık, beslenme düzensizlikleri, hafif dehidrasyon, vücut kondüsyonu, ateşli hastalıklar gibi renal fonksiyonla ilgisi olmayan durumlardan etkilenebilmektedir. Leishmaniasis, böbreklerde oluşturduğu ilerleyici hasar yönüyle renal biyobelirteçleri değerlendirmek için uygun bir hastalık modeli oluşurmaktadır (Paltrinieri ve diğerleri, 2016).

FGF-23 ve  $\alpha$ -Klotho geçtiğimiz 10 yıl içerisinde gerek kalsiyum-fosfor metabolizmasındaki önemli rolleriyle, gerek renal ve kardiyovasküler sistemdeki kompleks işlevleriyle insan ve farklı türlerde pek çok çalışmaya konu olmuştur. İnsanlardakine benzer



şekilde plazma FGF-23'ün KBH evrelerine paralel artış gösterdiği kedilerde (Finch ve diğerleri, 2013; Geddes ve diğerleri, 2015; Sargent ve diğerleri, 2019) ve yakın zamanda köpeklerde (Harjes ve diğerleri, 2017; Parker ve diğerleri, 2017; Rudinsky ve diğerleri, 2018) sınırlı sayıda çalışma ile gösterilmiştir. Köpeklerde FGF-23 ve  $\alpha$ -Klotho düzeylerinin birlikte değerlendirildiği bir çalışmaya ise ulaşamamıştır.

Köpeklerde FGF-23'ün değerlendirildiği ilk çalışmada plazma FGF-23 konsantrasyonlarının KBH'nin şiddeti ile artış gösterdiği ve IRIS evre 1 ve 2 ile evre 3 ve 4 arasında önemli farklılıklar olduğu belirlenmiştir (Harjes ve diğerleri, 2017). Dittmer ve diğerleri, (2017) tarafından gerçekleştirilen ikinci çalışmada KBH'li köpeklerde (n=20) serum fosfor ve FGF-23 konsantrasyonlarının artışı saptanmıştır. Parker ve diğerleri, (2017) tarafından KBH'nin farklı evrelerindeki köpeklerde D vitamini metabolitlerinin PTH, FGF-23, kalsiyum ve fosfor ile ilişkisinin değerlendirdiği çalışmada, sağlıklı köpeklere göre; IRIS evre 3 ve 4 olan köpeklerde tüm D vitamini metabolit konsantrasyonlarının önemli ölçüde düşük olduğu, Evre 1 ve 2'deki köpekler ile sağlıklı köpekler arasında ise fark belirlenmemiştir. Rudinsky ve diğerleri (2018), KBH'li köpeklerde hayatta kalma ile vücut ve kas kondüsyon skorları, hematokrit, kreatinin, serum fosfor, idrar protein/kreatinin oranı, PTH, 25-hidroksivitamin D, 1,25-dihidroksivitamin D ve FGF-23 konsantrasyonlarını değerlendirmiştir. Sonuç olarak; kas atrofisi, artmış kreatinin, hiperfosfatemi, artmış idrar protein/kreatinin oranı ve artmış FGF-23 tespit etmiş olup, hastalığın her evresinde hayatta kalma sürelerini anlamlı derecede farklı bulmuştur. Bu araştırmada sağlıklı grupla karşılaştırıldığında FGF-23 düzeyleri tüm evrelerde sağlıklı gruba göre yüksek ortanca değerlere sahip olmakla birlikte farklılıklar Evre III ( $p<0.05$ ) ve Evre IV ( $p<0.001$ ) gruplarında istatistiksel anlamlı bulundu. Evreler arasındaki değerlendirmede ise Evre IV grubunda Evre I ve II gruplarına göre yüksekti ( $p<0.05$ ). Bunun yanında FGF-23 düzeyi ile üre, kreatinin konsantrasyonları (zayıf) ve idrar protein/kreatinin oranı (orta) arasında pozitif yönde korelasyon belirlendi. Elde edilen veriler köpeklerde gerçekleştirilen önceki çalışmalara benzer bulundu (Harjes ve diğerleri, 2017; Rudinsky ve diğerleri, 2018). Plazma FGF-23 düzeyindeki artışların hastalığın ilerleyen evrelerinde daha belirgin ve serum üre, kreatinin konsantrasyonlarındaki artışla uyumlu olması nedeniyle hastalığın patofizyolojisine ilgili ilerideki çalışmalarda da parametrenin değerlendirilmesinin yararlı olabileceği düşünüldü.

Köpeklerde, serum çözünebilir  $\alpha$ -Klotho düzeylerinin değerlendirildiği yalnızca bir çalışmaya ulaşılmıştır (Yi ve diğerleri, 2020). İlgili çalışmada KBH'nin ileri aşamasındaki köpeklerde idrar ve serumda  $\alpha$ -Klotho düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre daha düşük

bulunmuştur. Söz konusu çalışmada idrar  $\alpha$ -Klotho düzeylerinin serum simetrik dimetilarginin, üre, kreatinin ve fosfor konsantrasyonlarıyla negatif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir. İdrar  $\alpha$ -Klotho konsantrasyonu IRIS evre 3 grubunda, kontrol ve evre 1 gruplarına kıyasla düşük; evre 3 ve evre 4 gruplarında evre 1 ve evre 2'ye göre düşük bulunduğu belirtilmektedir (Yi ve diğerleri, 2020). Evre 4 grubunda kontrol grubundan anlamlı olarak farklı olmamasına rağmen erken evrelerdekinden daha düşük olduğu bildirilmiştir. Ancak KBH'nin ileri evrelerindeki köpeklerde idrar Klotho düzeyi azalır ve çeşitli parametrelerle korelasyon gösterirken, serum  $\alpha$ -Klotho'da bu korelasyonların belirlenemediği ifade edilmektedir. Bu nedenle, böbrek fonksiyonu veya hasarının belirlenmesinde idrar Klotho düzeylerinin serum Klotho düzeyine göre daha anlamlı olabileceği vurgulanmıştır (Yi ve diğerleri, 2020). Aynı çalışmada serum  $\alpha$ -Klotho konsantrasyonu, evre 2 ve evre 3 köpeklerde kontrol köpeklerinden düşük olmasına rağmen, evre 3 köpeklerde daha yüksek tespit edilmiştir. Bu sonuçlar,  $\alpha$ -Klotho'nun plazma düzeylerinin böbrek fonksiyonu ile ilişkili olmadığını gösteren insan çalışmalarının bulgularıyla benzemektedir. 312 hasta insanda gerçekleştirilen bir kohort çalışmasında, plazma Klotho seviyelerinin KBH evreleri arasında farklılık göstermediği ve GFR veya diğer kalsiyum-fosfat metabolizması parametreleri ile anlamlı bir ilişkinin bulunmadığı belirtilmektedir (Seiler ve diğerleri, 2013). Çözünür  $\alpha$ -Klotho konsantrasyonları üzerine yapılan çalışmalar arasında belirlenen uyumsuz sonuçların bu parametrenin KBH biyobelirteci olarak kullanılmasını kısıtlayabileceği ifade edilmiştir. Çalışma sonuçları arası farklılıkların bir nedeni olarak da çözünür Klotho'nun analizinde standart bir testin olmayışı görülmektedir (Neyra ve diğerleri, 2017).

Araştırmacıların bilgisine göre bu çalışma, köpeklerde çözünebilir  $\alpha$ -Klotho'yu değerlendiren ikinci çalışmadır. Bu çalışma sonuçlarına göre  $\alpha$ -Klotho düzeyleri Leishmaniasis'li köpeklerde araştırmanın hipotezinde öngörülenin aksine yüksek belirlenirken, evreler arası farklılıklarda istatistiksel önem veya diğer parametrelerle anlamlı bir ilişki belirlenemedi. Bu bulgular KBH'li köpeklerde ve insanlarda gerçekleştirilen bazı çalışmalardan elde edilen sonuçlarla uyumluluk göstermektedir (Seiler ve diğerleri, 2013; Yi ve diğerleri, 2020). Ayrıca plazma Klotho'nun membranöz Klotho'yu yansıttığı öne sürülmekle birlikte, Klotho doku ekspresyonu, plazma Klotho seviyeleri ve Klotho üriner atılımı arasında farklılıklar olabileceği ifade edilmektedir (Yi ve diğerleri, 2020). FGF-23'ün hedef hücreleri üzerindeki membranöz Klotho proteininin miktarının belirlenmesi, klinik pratikte kolaylıkla uygulanamayan böbrek ve paratiroid bezi gibi hedef organlar üzerinde invaziv tanısal prosedürleri gerektirmektedir. Membranöz Klotho parçalanır ve dolaşıma salınır, böylece

ölçüm için daha kolay erişilebilir olan çözünür Klotho üretilir. Bununla birlikte, mevcut çözünür Klotho analizi yöntemleri, membranöz formun bölünmesinden üretilen tam uzunluktaki çözünür Klotho ile daha fazla bölünmüş K11 ve K12 Klotho fragmanları arasında ayırım yapamayabileceği bildirilmektedir (Chen ve diğerleri, 2014). Farklı Klotho formları arasındaki ilişkileri de ele alan yeni çalışmaların KBH'li köpeklerde Klotho'nun rolü konusunda daha fazla bilgi verebileceği düşünülmektedir.

Böbrekler, kalsiyum ve fosforun idrarla atılımını kontrol ettikleri, kalsitriol sentezledikleri ve PTH ve FGF-23 için hedef organ oldukları için mineral metabolizmasının düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar. Klotho'nun en yüksek ekspresyonuna sahip doku distal tübüldür (Chacar ve diğerleri, 2020). Klotho hipotezine göre, KBH ilerledikçe Klotho'nun ekspresyonu azalır. FGF-23 reseptörlerinin bağlanması için gerekli olan bir kofaktör olan Klotho'nun daha düşük ekspresyonu yanında böbrek kütesinin giderek azalması sonucu FGF-23'ün etkisine direnç gelişir ve bu durum fosfatüriyi azaltarak ve fosfat tutulmasına yol açar. Normofosfatemiyi sürdürmek için osteositler sürekli olarak FGF-23 sentezler. FGF-23'ün yüksek kan seviyeleri, 1-alfa-hidroksilaz enzimini inhibe ettiği ve böylece kalsitriol sentezini bloke ettiği için D vitamini metabolizması bozulur. Aynı zamanda, FGF-23, 24-hidroksilaz uyarımı ile kalsitriolün yıkımını artırır (Chacar ve diğerleri, 2020). Bu değişiklikler kronik böbrek hastalığına bağlı mineral kemik bozukluğunun ortaya çıkmasına aracılık etmektedir. İnsanlarda “kronik böbrek hastalığı-mineral kemik bozukluğu” terimi, düşük vitamin D, yüksek serum fosfat ve PTH düzeyleri ile renal osteodistrofi ve anormal mineral metabolizması ile karakterize edilen tabloyu tanımlamak için kullanılmıştır (Silver ve Naveh-Many, 2013). Mevcut araştırmada, Leishmaniasis'li köpekler sağlıklı köpekler ile karşılaştırıldığında serum PTH değerleri yüksek ( $p<0.001$ ), D vitamini ve kalsiyum konsantrasyonları ise düşük ( $p<0.001$ ) bulundu. Evreler arası değerlendirmede ise serum PTH konsantrasyonu tüm evrelerde sağlıklı gruba göre yüksek saptanırken, farklılıkların istatistiksel anlam ifade etmediği tespit edildi. Hastalığın tüm evrelerinde vitamin D ve kalsiyum konsantrasyonları sağlıklı gruba göre düşük belirlendi fakat evreler arasındaki farklar istatistiksel anlamlı bulunmadı. Fosfor konsantrasyonu Evre IV grubu köpeklerde diğer evrelere ve sağlıklı gruptaki köpeklere göre yüksekti. Elde edilen veriler Leishmaniasis'li köpeklerde kronik böbrek hastalığı-mineral kemik bozukluğu değerlendirmesine yönelik daha fazla araştırma yapılmasını destekler nitelikte görüldü.

Köpekler ve kediler, güneşe maruz kalma yoluyla D vitamini deri sentezini gerçekleştiremedikleri için diğer memeli türlerine kıyasla D vitamini metabolizmasında

farklılıklara sahiptir ve diyetle bu vitaminin yeterli miktarda alınması gerekir. D vitamininin klasik işlevleri, bağırsaktan kalsiyum ve fosfat emilimini, renal kalsiyum ve fosfat geri emilimini uyarmak ve kemik mineral metabolizmasını düzenlemektir. Bu nedenle kalsiyum ve fosfor homeostazı için önemlidir (Cortadellas ve diğerleri, 2010). Bu projede hasta köpeklerde belirlenen serum D vitamini düzeyindeki azalma daha önce Leishmaniasis'li köpeklerde düşük D vitamini belirlenen diğer bir araştırmayla uyumluydu (Rodriguez-Cortes ve diğerleri, 2017). Aynı zamanda çeşitli çalışmalarda, KBH'li köpeklerin sağlıklı köpeklere göre daha düşük 25(OH)D3 ve 1,25(OH)2D konsantrasyonlarına sahip olduğu bildirilmiştir (Cortadellas ve diğerleri, 2010; Parker ve diğerleri, 2017). Bazı çalışmalarda, KBH ve kontrol köpekleri arasındaki farklılıklara rağmen, birçok köpekte 25(OH)D3 ve 1,25(OH)2D konsantrasyonları referans değerlerde belirlenmiştir (Gerber ve diğerleri, 2003). Bu durum, farklı çalışmalarda kullanılan nispeten geniş referans aralıkları veya kullanılan laboratuvar tekniklerindeki farklılıklarla ilişkilendirilmiştir (Chacar ve diğerleri, 2020). Mevcut araştırmada vitamin D düzeylerini değerlendirme amacıyla ölçülen 25(OH)D3 konsantrasyonunun Leishmaniasis'li köpeklerde düşük bulunması hem hastalık hem de hastalığın ileri evrelerinde görülen KBH ile ilişkilendirilebilir. Bununla birlikte vitamin D'nin prognostik ve tedaviye yönelik kullanımına dair destekleyici veri oluşturmak için farklı vitamin D metabolitlerinin değerlendirildiği, karşılaştırmalı çalışmaların yapılmasının önemli olduğu belirtilmektedir (Parker ve diğerleri, 2017).

Bu çalışmada elde edilen bulguların değerlendirilmesinde bazı kısıtlayıcı faktörler de bulunmaktadır. Çalışma sonuçları ileride gerçekleştirilecek araştırmalara zemin hazırlamakla birlikte köpeklerde deneysel ya da doğal enfeksiyon modellerinde ilgili parametrelerin tekrarlayan ölçümleri, tedavi süreçlerindeki değişimlerinin izlenmesi ve daha fazla sayıda olgunun araştırmalara dahil edilmesi fayda sağlayabilecektir. Özellikle  $\alpha$ -Klotho konsantrasyonlarının değerlendirilmesinde serum yanında idrar numunelerinin de çalışılması ve farklı Klotho formlarının birlikte analizi elde edilebilecek sonuçları güçlendirebilir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu araştırmada öngörülen amaçlar doğrultusunda Leishmaniasis’li ve sağlıklı köpeklerde plazma FGF-23 ve  $\alpha$ -Klotho düzeyleri belirlenmiştir. Böbrek yetmezliği gelişmiş (evre III-IV) ve gelişmemiş (evre I-II) Leishmaniasis’li olgularda belirlenen değişiklikler karşılaştırıldığında FGF-23 düzeylerinin köpeklerde böbrek hasarının göstergesi olarak kullanılabileceği yönünde veriler (Harjes ve diğerleri, 2017; Parker ve diğerleri, 2017; Rudinsky ve diğerleri, 2018) desteklenmiştir. Leishmaniasis’li köpeklerde plazma FGF-23 ve serum  $\alpha$ -Klotho düzeyleri ile ilişkili olduğu belirtilen ve hastalığın ileri evrelerinde (Evre III-IV) gözlenebilecek “kronik böbrek hastalığı-mineral kemik bozukluğu”nda değişiklik gösterebilecek kalsiyum, fosfor, PTH ve vitamin D düzeyleri değerlendirildiğinde evrelere göre en belirgin değişikliğin fosfor düzeylerinde olduğu belirlenmiştir. FGF-23 düzeyi ile üre, kreatinin konsantrasyonları (zayıf) ve idrar protein/kreatinin oranı (orta) arasında pozitif yönde korelasyon belirlenirken,  $\alpha$ -Klotho ile diğer parametreler arasında anlamlı bir ilişki belirlenememiştir.

Sonuç olarak, mevcut araştırma ile literatür bilgiye katkı kapsamında Leishmaniasis’li köpeklerde plazma FGF-23 ve serum çözünebilir  $\alpha$ -Klotho düzeylerindeki artış ilk defa gösterilmiştir. FGF-23 düzeyindeki artışların hastalığın ilerleyen evrelerinde daha belirgin olduğu ve serum üre, kreatinin konsantrasyonlarındaki artışla uyumlu olduğu görölmüştür. Özellikle  $\alpha$ -Klotho konsantrasyonlarının ölçülmesinde serum yanında idrar numunelerinin de çalışılması ve farklı Klotho formlarının birlikte incelenmesinin önemli olabileceği değerlendirilmiştir. Elde edilen bulguların Leishmaniasis’de görülen böbrek hastalığının patofizyolojisinin açıklanmasına yönelik ileride gerçekleştirilecek tanısal ve tedaviye yönelik çalışmalara kaynak oluşturabileceği düşünölmüştür. Belirlenen değişikliklerin daha detaylı incelenmesi amacıyla hasta takibi ve tedaviyi de kapsayan daha fazla araştırma gerçekleştirilmesinin faydalı olabileceği kanısına varılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., ... WHO Leishmaniasis Control Team. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS One*, 7(5), e35671.
- Antinori, S., Cascio, A., Parravicini, C., Bianchi, R., Corbellino, M. (2008). Leishmaniasis among organ transplant recipients. *The Lancet Infectious Diseases*, 8(3), 191-199.
- Aresu, L., Benali, S., Ferro, S., Vittone, V., Gallo, E., Brovida, C., Castagnaro, M. (2013). Light and electron microscopic analysis of consecutive renal biopsy specimens from Leishmania-seropositive dogs. *Veterinary Pathology*, 50(5), 753-760.
- Ärnlöv, J., Carlsson, A. C., Sundström, J., Ingelsson, E., Larsson, A., Lind, L., Larsson, T. E. (2013). Higher fibroblast growth factor-23 increases the risk of all-cause and cardiovascular mortality in the community. *Kidney International*, 83(1), 160-166.
- Atasoy, A., Pasa, S., Ozensoy Toz, S., Ertabaklar, H. (2010). Seroprevalence of canine visceral leishmaniasis around the Aegean coast of Turkey. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 16(1), 1-6.
- Ayele, A. ve Seyoum, Z. (2016). Review on canine leishmaniasis, etiology, clinical sign, pathogenesis, treatment and control methods. *Global Veterinaria*, 17(4), 343-352.
- Bakirci, S., Bilgiç, H. B., Köse, O., Aksulu, A., Hacılarlıoğlu, S., Erdoğan, H., Karagenç, T. (2016). Molecular and seroprevalence of canine visceral leishmaniasis in West Anatolia, Turkey. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 40(5), 637-644.
- Baneth, G. (2014). Tick-borne infections of animals and humans: a common ground. *International Journal for Parasitology*, 44(9), 591-596.
- Baneth, G., Segev, G., Mazaki-Tovi, M., Chen, H., Kuzi, S. (2018). Renal dialysis and long-term treatment of a dog with kidney disease associated with canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, 11(1), 1-5.
- Bär, L., Stournaras, C., Lang, F., Föller, M. (2019). Regulation of fibroblast growth factor 23 (FGF 23) in health and disease. *FEBS Letters*, 593(15), 1879-1900.

- Bian, A., Xing, C., Hu, M. C. (2014). Alpha Klotho and phosphate homeostasis. *Journal of Endocrinological Investigation*, 37(11), 1121-1126.
- Cacheiro-Llaguno, C., Parody, N., Renshaw-Calderón, A., Osuna, C., Alonso, C., Carnés, J. (2020). Vaccination with LetiFend® reduces circulating immune complexes in dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Vaccine*, 38(4), 890-896.
- Ceron, J. J., Pardo-Marin, L., Caldin, M., Furlanello, T., Solano-Gallego, L., Tecles, F., ... Martínez-Subiela, S. (2018). Use of acute phase proteins for the clinical assessment and management of canine leishmaniosis: general recommendations. *BMC Veterinary Research*, 14(1), 1-5.
- Chacar, F. C., Kogika, M. M., Zafalon, R. V., Brunetto, M. A. (2020). Vitamin D metabolism and its role in mineral and bone disorders in chronic kidney disease in humans, dogs and cats. *Metabolites*, 10(12), 499.
- Chen, C. D., Tung, T. Y., Liang, J., Zeldich, E., Tucker Zhou, T. B., Turk, B. E., Abraham, C. R. (2014). Identification of cleavage sites leading to the shed form of the anti-aging protein klotho. *Biochemistry*, 53(34), 5579-5587.
- Ciaramella, P., Oliva, G. D., De Luna, R., Ambrosio, R., Cortese, L., Persechino, A., ... Scalone, A. (1997). A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record*, 141(21), 539-543.
- Coca, S. G. (2019). Kidney Injury Biomarkers with Clinical Utility: Has Godot Finally Arrived?. *American Journal of Nephrology*, 50(5), 357-361.
- Cortadellas, O., Del Palacio, M. F., Talavera, J., Bayón, A. (2008). Glomerular filtration rate in dogs with leishmaniasis and chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(2), 293-300.
- Cortadellas, O., Fernandez del Palacio, M. J., Talavera, J., Bayón, A. (2010). Calcium and phosphorus homeostasis in dogs with spontaneous chronic kidney disease at different stages of severity. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(1), 73-79.
- Çelik, B.A., Çelik, Ö.Y., Şahin, T. (2019). Türkiye’de Kanin Leishmaniasis’ in Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*. 33, 2, 123-130.

- Dantas-Torres, F. (2007). The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, 149(3-4), 139-146.
- Oliveira, V. V. G. D., Alves, L. C., Silva Junior, V. A. D. (2015). Transmission routes of visceral leishmaniasis in mammals. *Ciência Rural*, 45, 1622-1628.
- Di Loria, A., Squillacioti, C., De Luca, A., Veneziano, V., Mirabella, N., Guccione, J., Santoro, D. (2014). Increased leptin mRNA expression in the blood of dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *The Veterinary Journal*, 202(3), 634-636.
- Dittmer, K. E., Perera, K. C., Elder, P. A. (2017). Serum fibroblast growth factor 23 concentrations in dogs with chronic kidney disease. *Research in Veterinary Science*, 114, 348-350.
- Dumonteil, E., Jesus, R. S. M., Javier, E. O., del Rosario, G. M. M. (2003). DNA vaccines induce partial protection against *Leishmania mexicana*. *Vaccine*, 21(17-18), 2161-2168.
- Erben, R. G., ve Andrukhova, O. (2017). FGF23-Klotho signaling axis in the kidney. *Bone*, 100, 62-68.
- Finch, N. C., Geddes, R. F., Syme, H. M., Elliott, J. (2013). Fibroblast growth factor 23 (FGF-23) concentrations in cats with early nonazotemic chronic kidney disease (CKD) and in healthy geriatric cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(2), 227-233.
- Foglia Manzillo, V., Di Muccio, T., Cappiello, S., Scalone, A., Papparcone, R., Fiorentino, E., ... Oliva, G. (2013). Prospective study on the incidence and progression of clinical signs in naïve dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(5), e2225.
- Franc, M., Genchi, C., Bouhsira, E., Warin, S., Kaltsatos, V., Baduel, L., Genchi, M. (2012). Efficacy of dinotefuran, permethrin and pyriproxyfen combination spot-on against *Aedes aegypti* mosquitoes on dogs. *Veterinary Parasitology*, 189(2-4), 333-337.
- García-Martínez, J. D., Martínez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A., Caldin, M., Ceron, J. J. (2015). Urinary ferritin and cystatin C concentrations at different stages of kidney disease in leishmaniotic dogs. *Research in Veterinary Science*, 99, 204-207.
- García-Martínez, J. D., Tvarijonaviciute, A., Cerón, J. J., Caldin, M., Martínez-Subiela, S. (2012). Urinary clusterin as a renal marker in dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(2), 301-306.



- Gattineni, J., Bates, C., Twombly, K., Dwarakanath, V., Robinson, M. L., Goetz, R., ... Baum, M. (2009). FGF23 decreases renal NaPi-2a and NaPi-2c expression and induces hypophosphatemia in vivo predominantly via FGF receptor 1. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 297(2), F282-F291.
- Geddes, R. F., Elliott, J., Syme, H. M. (2015). Relationship between plasma fibroblast growth factor-23 concentration and survival time in cats with chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(6), 1494-1501.
- Gerber, B., Hässig, M., Reusch, C. E. (2003). Serum concentrations of 1, 25-dihydroxycholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol in clinically normal dogs and dogs with acute and chronic renal failure. *American Journal of Veterinary Research*, 64(9), 1161-1166.
- Gharbi, M., Mhadhbi, M., Rejeb, A., Jaouadi, K., Rouatbi, M., Darghouth, M. A. (2015). Leishmaniosis (*Leishmania infantum* infection) in dogs. *Revue Scientifique et Technique*, 34(2), 613-26.
- Giannuzzi, A. P., Ricciardi, M., De Simone, A., Gernone, F. (2017). Neurological manifestations in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*: descriptions of 10 cases and a review of the literature. *Journal of Small Animal Practice*, 58(3), 125-138.
- Giapitzoglou, S., Saridomichelakis, M. N., Leontides, L. S., Kasabalis, D., Chatzis, M., Apostolidis, K., ... Mylonakis, M. E. (2020). Evaluation of serum symmetric dimethylarginine as a biomarker of kidney disease in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, 277, 109015.
- Gizzarelli, M., Fiorentino, E., Ben Fayala, N. E. H., Montagnaro, S., Torras, R., Gradoni, L., ... Foglia Manzillo, V. (2020). Assessment of circulating immune complexes during natural and experimental canine leishmaniasis. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 273.
- Gutiérrez, O. M., Januzzi, J. L., Isakova, T., Laliberte, K., Smith, K., Collerone, G., ... Wolf, M. (2009). Fibroblast growth factor 23 and left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease. *Circulation*, 119(19), 2545-2552.
- Gutiérrez, O. M., Mannstadt, M., Isakova, T., Rauh-Hain, J. A., Tamez, H., Shah, A., ... Wolf, M. (2008). Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *New England Journal of Medicine*, 359(6), 584-592.

- Hardcastle, M. R. ve Dittmer, K. E. (2015). Fibroblast growth factor 23: a new dimension to diseases of calcium-phosphorus metabolism. *Veterinary Pathology*, 52(5), 770-784.
- Harjes, L. M., Parker, V. J., Dembek, K., Young, G. S., Giovaninni, L. H., Kogika, M. M., ... Toribio, R. E. (2017). Fibroblast growth factor-23 concentration in dogs with chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31(3), 784-790.
- Hu, M.C., Kuro-o, M., Moe, O. W. (2013). Klotho and chronic kidney disease. *Phosphate and Vitamin D in Chronic Kidney Disease*, 180, 47-63.
- Hu, M. C., Shi, M., Gillings, N., Flores, B., Takahashi, M., Kuro-o, M., Moe, O. W. (2017). Recombinant  $\alpha$ -Klotho may be prophylactic and therapeutic for acute to chronic kidney disease progression and uremic cardiomyopathy. *Kidney International*, 91(5), 1104-1114.
- Hu, M. C., Shi, M., Zhang, J., Quiñones, H., Kuro-o, M., Moe, O. W. (2010). Klotho deficiency is an early biomarker of renal ischemia–reperfusion injury and its replacement is protective. *Kidney International*, 78(12), 1240-1251.
- IRIS, 2015. “IRIS CKD Guidelines Updates 2014 – 2015”, [http://www.iris-kidney.com/guidelines/guidelines\\_updates\\_2014-2015.aspx](http://www.iris-kidney.com/guidelines/guidelines_updates_2014-2015.aspx)
- Isakova, T., Xie, H., Yang, W., Xie, D., Anderson, A. H., Scialla, J., ... Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study Group. (2011). Fibroblast growth factor 23 and risks of mortality and end-stage renal disease in patients with chronic kidney disease. *Jama*, 305(23), 2432-2439.
- Karkamo, V., Kaistinen, A., Näreaho, A., Dillard, K., Vainio-Siukola, K., Vidgrén, G., ... Anttila, M. (2014). The first report of autochthonous non-vector-borne transmission of canine leishmaniosis in the Nordic countries. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56(1), 1-7.
- Kogika, M. M., Lustoza, M. D., Hagiwara, M. K., Caragelasco, D. S., Martorelli, C. R., Mori, C. S. (2015). Evaluation of oxidative stress in the anemia of dogs with chronic kidney disease. *Veterinary Clinical Pathology*, 44(1), 70-78.
- Koutinas, A. F. ve Koutinas, C. K. (2014). Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in Canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Veterinary Pathology*, 51(2), 527-538.
- Koutinas, A. F., Polizopoulou, Z. S., Saridomichelakis, M. N., Argyriadis, D., Fytianou, A., Plevraki, K. G. (1999). Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in

- Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *Journal of the American Animal Hospital Association*, 35(5), 376-383.
- Kuro-o, M. (2019). The Klotho proteins in health and disease. *Nature Reviews Nephrology*, 15(1), 27-44.
- Ma, D. D. F., Concannon, A. J., Hayes, J. (1979). Fatal leishmaniasis in renal-transplant patient. *The Lancet*, 314(8137), 311-312.
- Maia, C. ve Campino, L. (2018). Biomarkers associated with *Leishmania infantum* exposure, infection, and disease in dogs. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 302.
- Marangoni, N. R., Melo, G. D., Moraes, O. C., Souza, M. S., Perri, S. H. V., Machado, G. F. (2011). Levels of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the cerebrospinal fluid of dogs with visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 33(6), 330-334.
- Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., Gradoni, L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27(2), 123-147.
- Martinez-Subiela, S., Cerón, J. J., Strauss-Ayali, D., Garcia-Martinez, J. D., Tecles, F., Tvarijonaviciute, A., ... Baneth, G. (2014). Serum ferritin and paraoxonase-1 in canine leishmaniosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 37(1), 23-29.
- Martínez-Subiela, S., García-Martínez, J. D., Tvarijonaviciute, A., Tecles, F., Caldin, M., Bernal, L. J., Cerón, J. J. (2013). Urinary C reactive protein levels in dogs with leishmaniasis at different stages of renal damage. *Research in Veterinary Science*, 95(3), 924-929.
- Meléndez-Lazo, A., Ordeix, L., Planellas, M., Pastor, J., & Solano-Gallego, L. (2018). Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: Comparison of five different clinical classification systems. *Research in Veterinary Science*, 117, 18-27.
- Moreira, M. A. B., Luvizotto, M. C. R., Garcia, J. F., Corbett, C. E. P., Laurenti, M. D. (2007). Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Veterinary Parasitology*, 145(3-4), 245-252.

- Morillas-Marquez, F., Martin-Sanchez, J., Acedo-Sanchez, C., Pineda, J. A., Macias, J., Sanjuan-Garcia, J. (2002). *Leishmania infantum* (Protozoa, kinetoplastida): transmission from infected patients to experimental animal under conditions that simulate needle-sharing. *Experimental Parasitology*, 100(1), 71-74.
- Naucke, T. J., Amelung, S., Lorentz, S. (2016). First report of transmission of canine leishmaniosis through bite wounds from a naturally infected dog in Germany. *Parasites & Vectors*, 9(1), 1-4.
- Naucke, T. J., Amelung, S., Lorentz, S. (2016). First report of transmission of canine leishmaniosis through bite wounds from a naturally infected dog in Germany. *Parasites & Vectors*, 9(1), 1-4.
- Neyra, J. A., Hu, M. C. (2017). Potential application of klotho in human chronic kidney disease. *Bone*, 100, 41-49.
- Nicolle, C. ve Comte, C. (1908). Origine canine du Kala-azar, *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, vol. 1, 299–301.
- Nitta, K., Nagano, N., Tsuchiya, K. (2014). Fibroblast growth factor 23/klotho axis in chronic kidney disease. *Nephron Clinical Practice*, 128(1-2), 1-10.
- Palacio, J., Liste, F., Gascon, M. (1995). Urinary protein/creatinine ratio in the evaluation of renal failure in canine leishmaniasis. *The Veterinary Record*, 137(22), 567-568.
- Paltrinieri, S., Gradoni, L., Roura, X., Zatelli, A., Zini, E. (2016). Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Veterinary Clinical Pathology*, 45(4), 552-578.
- Paltrinieri, S., Solano-Gallego, L., Fondati, A., Lubas, G., Gradoni, L., Castagnaro, M., ... Zini, E. (2010). Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236(11), 1184-1191.
- Panesso, M. C., Shi, M., Cho, H. J., Paek, J., Ye, J., Moe, O. W., Hu, M. C. (2014). Klotho has dual protective effects on cisplatin-induced acute kidney injury. *Kidney International*, 85(4), 855-870.
- Pardo-Marín, L., Martínez-Subiela, S., Pastor, J., Tvarijonaviciute, A., Garcia-Martinez, J. D., Segarra, S., Cerón, J. J. (2016). Evaluation of various biomarkers for kidney monitoring during canine leishmaniosis treatment. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 1-7.

- Parker, V. J., Harjes, L. M., Dembek, K., Young, G. S., Chew, D. J., Toribio, R. E. (2017). Association of vitamin D metabolites with parathyroid hormone, fibroblast growth factor-23, calcium, and phosphorus in dogs with various stages of chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31(3), 791-798.
- Paz, G. F., Ribeiro, M. F., de Magalhães, D. F., Sathler, K. P., Morais, M. H. F., Fiúza, V. O., ... Dias, E. S. (2010). Association between the prevalence of infestation by *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* and the presence of anti-Leishmania antibodies: A case-control study in dogs from a Brazilian endemic area. *Preventive Veterinary Medicine*, 97(2), 131-133.
- Proverbio, D., Perego, R., Spada, E. (2016). The use of two clinical staging systems of canine leishmaniasis in a clinical setting: a critical evaluation. *Journal of Veterinary Clinical Practice and Petcare*, 1-3.
- Ramon, I., Kleynen, P., Body, J. J., Karmali, R. (2010). Fibroblast growth factor 23 and its role in phosphate homeostasis. *European Journal of Endocrinology*, 162(1), 1.
- Ribeiro, R. R., Silva, S. M. D., Fulgêncio, G. D. O., Michalick, M. S. M., Frézard, F. J. G. (2013). Relationship between clinical and pathological signs and severity of canine leishmaniasis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22, 373-378.
- Ribeiro, R. R., Michalick, M. S. M., da Silva, M. E., Dos Santos, C. C. P., Frézard, F. J. G., da Silva, S. M. (2018). Canine leishmaniasis: an overview of the current status and strategies for control. *BioMed Research International*, 2018.
- Rodríguez-Cortes, A., Martori, C., Martinez-Florez, A., Clop, A., Amills, M., Kubejko, J., ... Alberola, J. (2017). Canine leishmaniasis progression is associated with vitamin D deficiency. *Scientific Reports*, 7(1), 1-10.
- Roura, X., Cortadellas, O., Day, M. J., Benali, S. L., D'Anna, N., Fondati, A., ... Zatelli, A. (2020). Canine leishmaniosis and kidney disease: Q&A for an overall management in clinical practice. *Journal of Small Animal Practice*, Early-View.
- Roura, X., Fondati, A., Lubas, G., Gradoni, L., Maroli, M., Oliva, G., ... Zini, E. (2013). Prognosis and monitoring of leishmaniasis in dogs: A working group report. *The Veterinary Journal*, 198(1), 43-47.

- Rudinsky, A. J., Harjes, L. M., Byron, J., Chew, D. J., Toribio, R. E., Langston, C., Parker, V. J. (2018). Factors associated with survival in dogs with chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(6), 1977-1982.
- Owens, S. D., Oakley, D. A., Marryott, K., Hatchett, W., Walton, R., Nolan, T. J., ... Giger, U. (2001). Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 219(8), 1076-1083.
- Olauson, H. (2013). *The Role of Fgf23/Klotho in Mineral Metabolism and Chronic Kidney Disease*. Doktora Tezi, Karolinska Institutet, Stockholm, İsveç.
- Saito, H., Kusano, K., Kinoshita, M., Ito, H., Hirata, M., Segawa, H., ... Fukushima, N. (2003). Human fibroblast growth factor-23 mutants suppress Na<sup>+</sup>-dependent phosphate co-transport activity and 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> production. *Journal of Biological Chemistry*, 278(4), 2206-2211.
- Sargent, H. J., Jepson, R. E., Chang, Y. M., Biourge, V. C., Bijmans, E. S., Elliott, J. (2019). Fibroblast growth factor 23 and symmetric dimethylarginine concentrations in geriatric cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(6), 2657-2664.
- Seiler, S., Wen, M., Roth, H. J., Fehrenz, M., Flügge, F., Herath, E., ... Heine, G. H. (2013). Plasma Klotho is not related to kidney function and does not predict adverse outcome in patients with chronic kidney disease. *Kidney International*, 83(1), 121-128.
- Silver, J. ve Naveh-Many, T. (2013). FGF-23 and secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease. *Nature Reviews Nephrology*, 9(11), 641-649.
- Soares, M. J. V., Moraes, J. R. E., Moraes, F. R. D. (2009). Renal involvement in canine leishmaniasis: a morphological and immunohistochemical study. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61, 785-790.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., ... Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165(1-2), 1-18.
- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., ... Baneth, G. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, 4(1), 1-16.

- Svobodova, V., Svoboda, M., Friedlaenderova, L., Drahotsky, P., Bohacova, E., Baneth, G. (2017). Canine leishmaniosis in three consecutive generations of dogs in Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 237, 122-124.
- Tonin, A. A., Calado, A. M., Bottari, N. B., Dalenogare, D., Thomé, G. R., Duarte, T., ... Da Silva, A. S. (2016). Novel markers of inflammatory response and hepatic dysfunction in canine leishmaniasis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 44, 61-64.
- Torrent, E., Planellas, M., Ordeix, L., Pastor, J., Rodon, J., Solano-Gallego, L. (2018). Serum symmetric dimethylarginine as an early marker of excretory dysfunction in canine leishmaniosis (*L. infantum*) induced nephropathy. *Veterinary Medicine International*, 2018.
- Tvarijonaviciute, A., Ceron, J. J., García-Martinez, J. D. (2012). Serum and urinary adiponectin in dogs with renal disease from leishmaniasis. *Veterinary Record*, 171(12), 297-297.
- Urakawa, I., Yamazaki, Y., Shimada, T., Iijima, K., Hasegawa, H., Okawa, K., ... Yamashita, T. (2006). Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature*, 444(7120), 770-774.
- Voyvoda, H. ve Paşa, S. (2004). Aydın'ın bazı ilçe ve köyleri ile İzmir'in Selçuk İlçesindeki köpeklerde Leishmaniosis ve Dirofilariasis' in prevalansı. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28(6), 1105-1111.
- Yi, H., Lee, J., Lee, K., Y. I., Song, K., won Seo, K. (2020). Investigation on urinary and serum alpha klotho in dogs with chronic kidney disease. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 1-9.
- Zou, D., Wu, W., He, Y., Ma, S., Gao, J. (2018). The role of klotho in chronic kidney disease. *BMC Nephrology*, 19(1), 1-12.

# EKLER

## Ek-1 (ADÜ-HADYEK)



T.C.  
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU  
(AYDIN ADÜ-HADYEK)



Aydın, 21/01/2021

**Oturum** : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2021 Yılı I. Oturum  
**Sayı** : 64583101/2021/001  
**Proje Başlığı** : Leishmaniasis'in farklı evrelerindeki köpeklerde fibroblast büyüme faktörü-23 ve alfa-klotho konsantrasyonları ile ilişkili parametrelerin değerlendirilmesi  
**Proje Yürütücüsü** : Gamze GÜLTEKİN  
**Proje Ekibi** : Pınar Alkım ULUTAŞ

**Bu çalışmanın hiçbir bölümünde:**

İnsan embriyosu ve fötüsü kullanılması  
İnsan embriyosu ve fötüsü dokularının kullanılması  
Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması

**Hayvan Çalışması**

İnsanlarda araştırma  
İnsan olmayan primatların kullanılması  
Transgenik hayvanların kullanılması  
Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.

**Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır.**

Prof. Dr. Murat SAKIERLER  
Başkan

Prof. Dr. M. Dinçer BİLGİN  
Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Turhan DOST  
Üye

Prof. Dr. Özgür ERKOZAN  
Üye

Prof. Dr. Işıl SONMEZ  
Üye

Doç. Dr. Serkan BAKIRCI  
Üye

(Toplantıya Katılmadı)  
Dr. Öğr. Üyesi Umur DEMETOĞLU  
Üye

Dr. Öğr. Üyesi A. Önder ÜSTÜNDAĞ  
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Aysun KOÇ  
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Solmaz KARAARSLAN  
Üye

Öğr. Gör. Dr. Asude Gülce GÜLEK Sor. Vet. Hek.  
Üye

Vet. Hek. Dr. Serdar AKTAŞ  
Sor. Vet. Hek.  
Üye

(Toplantıya Katılmadı)  
Hidayet YAMAN  
Serbest Vet. Hek. Üye

Şenay TEKİNBAS  
HAYTAP Üye.

(Toplantıya Katılmadı)  
Mustafa ÇOBANOĞLU  
Sivil Üye

Bu rapor, sadece Adnan Menderes Üniversitesi'nde yapılacak çalışmalar için geçerlidir.



## Ek – 2 (BİLGİ ONAM FORMU)

### BİLGİ ONAM FORMU

Tarih

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya ABD Öğretim Üyesi Pınar Alkım ULUTAŞ'ın danışmanı olduğu Doktora Öğrencisi Gamze GÜLTEKİN'in '*Leishmaniasis'in Farklı Evrelerindeki Köpeklerde Fibroblast Büyüme Faktörü-23 ve Alfa-Klotho Konsantrasyonları ile İlişkili Parametrelerin Değerlendirilmesi*' başlıklı araştırması için sahip olduğum köpekten kan örnekleri alınarak laboratuvar analizlerinin gerçekleştirileceği ve toplanan verilerin bu çalışma dışında başka herhangi bir çalışma için kullanılmayacağı sözlü ve yazılı olarak şahsıma bildirilmiştir.

Hayvan sahibi olarak, köpeğimin yukarıda adı geçen çalışmada yer almasını kabul ediyorum.

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

**BİLİMSEL ETİK BEYANI**

“Leishmaniasis’in Farklı Evrelerindeki Köpeklerde Fibroblast Büyüme Faktörü-23 ve Alfa-Klotho Konsantrasyonları ile İlişkili Parametrelerin Değerlendirilmesi” başlıklı Doktora tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Gamze GÜLTEKİN

/ /

## ÖZ GEÇMİŞ

**Soyadı, Adı** : GÜLTEKİN, Gamze  
**Uyruk** : T.C.  
**Doğum yeri ve tarihi** : Çorum 25/07/1984  
**Telefon** : 05362624426  
**E-posta** : gbalat@adu.edu.tr  
**Yabancı Dil** : İngilizce

## EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya (Veteriner)	2022
Y. Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji	2016
Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2014

## İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Unvan
2007-Devam Ediyor	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi	Laborant

## AKADEMİK YAYINLAR

### 1. MAKALELER

#### A) Uluslararası Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Parin, U., Erbas, G., Ural, K., Savasan, S., Yuksel, H.T., **Balat, G.**, Kirkan, S. (2020). Investigation of bacterial and fungal agents from cutaneous lesions in canine Leishmaniasis. *Indian Journal of Animal Research*, 54(1), 96-100.
2. Gultekin, M., Voyvoda, H., Ural, K., Erdogan, H., Balikci, C., **Gultekin, G.** (2019). Plasma citrulline, arginine, nitric oxide, and blood ammonia levels in neonatal calves with acute diarrhea. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(2), 987-998.
3. Kirkan, S., Parin, U., **Balat, G.** (2018). Antimicrobial resistance of *Enterococcus faecium* isolated from the urinary system of dogs. *Macedonian Veterinary Review*, 42 (1), 1-7.
4. Erbas, G., U. Parin, S. Kirkan, S. Savasan, H. T. Yüksel,, **Balat, G.** (2018). Molecular identification of Tick-Borne zoonotic bacteria in one humped camel (*Camelus dromedarius*). *Journal of Camel Practice and Research*, 25 (1), 89-92.
5. Parin, U., Erbas, G., Ural, K., Savasan, S., Yuksel, H.T., **Balat, G.**, Kirkan, Ş., Investigation of bacterial and fungal agents from cutaneous lesions in canine Leishmaniasis. *Indian Journal of Animal Research*, 2(10), 15-887.
6. Parin, U., Erbas, G., Kirkan, S., Savasan, S., Yuksel, H.T., **Balat, G.** (2018). Detection of *Candida* species by nested PCR method in one-humped camels (*Camelus dromedarius*). *Tropical Animal Health and Production*, 50(2), 421-425.
7. Erbas, G., Parin, U., Kirkan, S., Ural, K., Yuksel, H. T., **Balat, G.** (2016). Identification of bacterial pathogens that cause urinary tract infections and detection of their antibiotic susceptibility. *Indian Journal of Animal Research*, B403, 1-5.

#### B) Ulusal Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Gültekin, M., Paşa, S., Ural, K., Balıkçı, C., GS, E.A., **Gültekin, G.** (2017). Oxidative status and lipid profile among dogs at different stages of visceral leishmaniasis. *Turkiye Parazitoloji Dergisi*, 41(4), 183-187.
2. Özavcı, V., Parın, U., Kirkan, Ş., **Balat, G.** (2014). Isolation and antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* from snow geese. *Animal Health Production and Hygiene*, 3(2), 327-329.

## 2. SEMİNERLER

Türü	Adı	Tarihi
Doktora Semineri II	Kütle Spektrometrisi	2019
Doktora Semineri I	Visseral Leishmaniasisli Köpeklerde Güncel Biyobelirteçler	2018
Yüksek Lisans Tezi	Köpeklerin Üriner Sisteminden Elde Edilen Vankomisin Dirençli Enterokok Türlerinin Antimikrobiyal Duyarlılıkları	2016
Yüksek Lisans Semineri	Kedi ve Köpeklerde Üriner Sistem Enfeksiyonları	2015

## 3. PROJELER

Proje No	Projedeki Görevi	Proje Adı	Başlama-Bitiş Tarihi
<b>TÜBİTAK 1002</b>	<b>Yürütücü (Doktora Tez Projesi)</b>	Leishmaniasis'in farklı evrelerindeki köpeklerde fibroblast büyüme faktörü-23 ve alfa-klotho konsantrasyonları ile ilişkili parametrelerin değerlendirilmesi	01.04.2021 – 01.04.2022
ADÜBAP VTF-21003	Araştırmacı	Leishmaniasis'li köpeklerde angiopoietin 1 ve 2 ile vasküler endotel büyüme faktörü düzeylerinin araştırılması	18-02-2021- 18-02-2023
ADÜBAP VTF - 18030	Araştırmacı	Aydın ili ve çevresinde ishalleri kuzu ve oğlaklarda <i>Cryptosporidium</i> izolatlarının moleküler karakterizasyonu	2018-2021
ADÜBAP VTF - 15067	Araştırmacı (Yüksek Lisans Tez Projesi)	Köpeklerin Üriner Sisteminden Elde Edilen Vankomisin Dirençli Enterokok Türlerinin Antimikrobiyal Duyarlılıkları	2015-2016

## 4. BİLDİRİLER

### A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

- Gültekin, M., Voyvoda, H., Ural, K., Erdogan, H., Balıkcı, C., **Gültekin, G.** (2019). Evaluation of plasma citrulline concentration in calves with acute diarrhea, 2. Uluslararası 13. Ulusal Veteriner İç Hastalıkları Kongresi, Ankara, Türkiye. (Özet bildiri/Sözlü sunum)
- Gültekin, M., Ural, K., **Gültekin, G.**, Paşa, S. (2018). A review of Leishmaniasis in dogs and cats in Turkey, First International Caparica Congress on Leishmaniasis, (Özet bildiri/Sözlü sunum)

3. Gültekin, M., Ural K., Erdoğan H., Paşa S., Ekren Aşıcı G.S., **Gültekin G.**, Güler A.G., (2017). Oxidative status in neonatal calves with acute infectious diarrhea: preliminary findings. II. International Congress on Advances in Veterinary Sciences Technics, 2(1), 87-87. (Özet Bildiri/Sözlü sunum)
4. Gültekin M., Paşa S., Ural K., Balıkçı C., Ekren Aşıcı G.S., **Gültekin G.** (2017). Oxidative status and lipid profile among dogs at different stages of visceral leishmaniasis. II. International Congress on Advances in Veterinary Sciences Technics, 2(1), 188-188. (Özet Bildiri/Poster sunum)

#### **B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler**

1. Parın, U., Erbaş, G., Savaşan, S. Yüksel, T.H., **Balat G.**, Kırkan, Ş. (2016). Tek hörgüçlü develerde *Camelus dromedarius* kene kökenli zoonotik bakterilerin varlığının araştırılması. XII. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı). Kapadokya, Nevşehir, Türkiye.
2. Erbaş, G., Parın, U., Savaşan, S. Yüksel, T.H., **Balat, G.**, Kırkan, Ş. (2016). Tek hörgüçlü develerde *Camelus dromedarius* Candida türlerinin Nested PCR ile araştırılması. XII. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı). Kapadokya, Nevşehir, Türkiye.
3. Kırkan Ş., Ural K., Parın U., Erbaş G., Yüksel T.H., **Balat G.**, Erinç S.M., Gültekin M. (2015) İdrar yolu infeksiyonlarına neden olan bakteriyel patojenlerin identifikasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi. 11. Veteriner İç Hastalıkları Kongresi, Samsun, Türkiye.
4. Kırkan Ş., Ural K., Parın U., Erbaş G., Yüksel T.H., **Balat G.**, Gültekin M., Balıkçı C. Canine Visceral Leishmaniasis ile ilişkili kutanöz lezyonlardan diğer infeksiyöz patojenlerin izolasyonu, 11. Veteriner İç Hastalıkları Kongresi, Samsun, Türkiye.