

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI



**TÜBERKÜLOZİSLİ SIĞIRLARDAN ANTİOKSİDAN
PARAMETRELERDEKİ DEĞİŞİMLER**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YUNUS KELTEK

2016

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Haydar ÖZDEMİR
İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ömer KIZIL

Danışman

Yüksek Lisans/Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ömer KIZIL

Doç. Dr. Engin BALIKÇI

Yrd. Doç. Dr. Akın KIRBAŞ

TEŞEKKÜR

Bu çalıŐmayı değerli katkılarıyla yönlendiren ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı đretim yesi Prof. Dr. Ömer KIZIL'a teşekkür ederim.

Ayrıca çalıŐmalarım sırasında bana yardımcı olan Erzincan İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüęü personeli Veteriner Hekimi Yunus KOÇ ve Veteriner Sağlık Teknisyeni Emre KÜTÜK'e de yardımlarından dolayı teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	I
TEŞEKKÜR	II
İÇİNDEKİLER	III
ŞEKİLLER TABLOSU	IV
TABLolar LİSTESİ	V
KISALTMALAR LİSTESİ	VI
1.ÖZET	VII
2.ABSTRACT	VIII
3. GİRİŞ	1
3.1. Tüberkülozis	1
3.2. Reaktif Oksijen Türleri ve Neden Oldukları Bozukluklar	7
3.3. Lipit Peroksidasyonu (LPO).....	9
3.4. Antioksidan Sistemler	9
4. GEREÇ ve YÖNTEM	13
5. BULGULAR	17
6. TARTIŞMA	20
7. KAYNAKLAR	24
8. ÖZGEÇMİŞ	35

ŞEKİLLER TABLOSU

- ŞEKİL 1.** DERİ İÇİ TÜBERKÜLİN TESTİNDE KULLANILAN KOMPAS, ENJEKTÖR VE PPD
MAMALİAN PREPARATI..... 15
- ŞEKİL 2 .** PPD MAMALİAN TÜBERKÜLİN UYGULANDIKTAN 72 SAAT SONRA SAPTANAN
POZİTİF DERİ REAKSİYONLARI. 18
- ŞEKİL 3.** TÜBERKÜLOZ SAPTANAN SIĞIRLARIN ORGANLARINDAKİ LEZYONLAR..... 18



TABLÖLAR LİSTESİ

TABLO 1 : TÜBERKÜLOZ YÖNÜNDEN POZİTİF VE NEGATİF SAPTANAN İNEKLERDE OKSİDAN VE ANTİOKSİDAN PARAMETRELERİN ORTALAMA DEĞERLERİ İLE İSTATİSTİKSEL ÖNEM DERECELERİ.....	19
--	----



KISALTMALAR LİSTESİ

MTBC: Mycobacterium Tuberculosis Complex

PPD: Purifiye Protein Derivates

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

OH[·]: Hidroksil radikali

O₂^{·-}: Süperoksit radikali

H₂O₂: Hidrojen peroksit

SOD: Süperoksit dismutaz

LPO: Lipid peroksidasyon

MDA: Malondialdehid

GSH-Px: Glutatiyon peroksidaz

GSH: Glutatiyon

CAT: Katalaz

1.ÖZET

Bu çalışma, tüberkülozisli sığırlarda antioksidan parametrelerdeki değişimi belirlemek amacıyla yapılmıştır. Çalışmada 15 tüberkülozisli ve 15 sağlıklı toplam 30 adet inek kullanılmıştır. Tüberkülozisin teşhisinde deri içi PPD mamalian tüberkülin testi kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan pozitif kan örnekleri tek tüberkülin uygulamasından 72 saat sonra deri kalınlığı 4mm'den kalın olan hayvanlardan, kontrol grubunu oluşturan kan örnekleri ise deri kalınlığı 2 mm'den fazla olmayan hayvanlardan alınan örneklerden oluşmaktadır. Hem tüberkülozisli hem de kontrol grubundaki hayvanların V. jugularislerinden kan örnekleri alınmış, 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra örnekler epandorf tüplere alınarak, -20 °C'de dondurularak en kısa sürede analizleri yaptırılmıştır. Lipid peroksidasyonu (MDA) tayininde Placer, GSH-Px tayininde Lawrence, GSH tayininde Sedlak ve katalaz enzim aktivitesinin tayininde ise Goth'un tanımladığı yöntemler kullanılmıştır. Vitamin E ile vitamin A düzeyleri ticari test kitleri yardımıyla HPLC cihazında belirlenmiştir. Vitamin C düzeyleri ise kolorimetrik olarak belirlenmiştir. Gruplar arasında malondialdehid (MDA), glutatyon peroksidaz (GSHPx), glutatyon (GSH), vitamin E ve vitamin C bakımından istatistiksel önem saptanmasına rağmen, katalaz ve vitamin A yönünden herhangi bir önem saptanmamıştır. Sonuç olarak tüberkülozisli sığırlarda lipid peroksidasyon ve antioksidan parametrelerde önemli değişimler belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Antioksidan, lipid peroksidasyon, sığır, tüberkülozis.

2.ABSTRACT

THE CHANGES OF ANTIOXIDANT PARAMETERS IN THE CATTLE WITH TUBERCULOSIS

The study was conducted to detect the changes of antioxidant parameters in cattle with tuberculosis. The study was conducted on 30 cattle consist of 15 cattle with tuberculosis and 15 healthy cattle. Intradermal PPD mamalian tuberculin test was used for diagnosis of tuberculosis. Positive blood samples used in the study of a single tuberculin application 72 hours after the skin thickness is 4 mm thick with animals, the control group, blood samples forming the skin thickness is comprised of samples from animals of not more than 2 mm. Blood samples were taken from the jugular vein of both tuberculosis and control animals, centrifuged at 3000 rpm for 5 minutes, after taking the samples in the epandorf tubes was frozen at -20°C and as soon as the analysis has been done. Lipid peroxidation (MDA), GSH-Px, GSH, and catalase were determined to Placer, Lawrence, Sedlak and Goth, respectively. Vitamin E and vitamin A levels were determined by HPLC unit using commercially available test kits. The vitamin C levels were determined colorimetrically. Although the significant differences were determined in malondialdehyde (MDA), glutathion peroxidase (GSH-Px), glutatione (GSH), vitamin E and vitamin C levels between groups, the significantly changes wasn't determined in the catalase and vitamin A levels. In conclusion, an important changes was determined in the lipid peroxidation and antioxidant parameters in the cattle with tuberculosis.

Key words: Antioxidant, lipid peroxidation, cattle, tuberculosis.

3. GİRİŞ

3.1. Tüberkülozis

Mycobacterium'lar Mycobacteriaceae familyasında ve Mycobacteria cinsinde sınıflandırılmıştır (1). Mycobacterium tuberculosis kompleks (MTBC), genetik ve bakteriyolojik olarak birbirleriyle ilişkili değişik türlerinin oluşturduğu gruba verilen isim olup (2), bu grup içerisinde *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. bovis BCG* (3), *M. canetti* (4) ve *M. caprae* (5)'ı yer almaktadır. MTBC içerisindeki türler insan ve memeli hayvanları etkileyerek kronik granülamatöz bir hastalık olan tüberküloza neden olmaktadır. Bu kompleks içerisinde en geniş konakçı dağılımına sahip olanı *M. bovis* olup hem insanlarda hem de çok sayıda memelide hastalığa neden olabilmektedir (6).

Sığırlarda hastalığın etkeni gram (+), aerobik ve sporlu olmayan *Mycobacterium bovis*'tir. *M. bovis* için sığırlar başlıca konakçı olmasına rağmen diğer evcil ve yabani memelilerde de hastalık oluşturabilir. Kuşların her ne kadar *M. bovis*'e dirençli oldukları düşünülse de, kuşlarında duyarlı oldukları hakkında biraz da olsa bilgi mevcuttur (7,8).

M. bovis öncelikle sığırları enfekte etmekle birlikte bunun yanında değişik çiftlik hayvanlarını (domuz, koyun, keçi, at ve kanatlılar), etçilleri (kedi, köpek) ve bazı yabani türleri (geyik, tilki ve ferret'ler) etkileyen zoonotik bir türdür (6,9). Hastalığın meydana gelişinde değişik faktörler etkili olup bunlar arasında hayvanın yaşı, çevre ve iklim şartlarının da etkisi vardır (10).

M. bovis özellikle soğuk, karanlık ve nemli çevre şartlarında uzun süreler canlı kalabilir. Sıcaklığın 12-24°C olduğu şartlarda güneş ışığına maruz kalma süresiyle bağlantılı olarak 18-322 gün arasında canlı kalabilir. Özellikle yabani taşıyıcılar sığırlar için hastalık kaynağını oluşturmaktadırlar (7,8).

M. bovis başlıca aerosollerin inhalasyonu, sindirim veya hasarlı deriden bulaşabilir. Bulaşma yollarının önemi etkilenen türler arasında değişik olup, sığırlar etkenleri başlıca solunum akıntıları, gayta ve süt yoluyla, bazen de vaginal akıntılar veya semen yoluyla saçarlar (11). Özellikle ilerlemiş hastalık dönemlerinde saçılan etken oranı oldukça fazladır. Sığırlarda ortaya çıkan çoğu olayda hastalık etkeni hayvanların yakın teması sebebiyle aerosoller yoluyla bulaşır. Bazı vakalarda etkenlerin yenilmesi sonucunda da enfeksiyon oluşabilir ki bu yol özellikle hastalıklı sığırlardan sütle beslenen buzağılar için önem arz etmektedir. Hastalık sürecinde deride, genital kanalda lezyonlar ile kongenital belirtiler nadiren de olsa görülebilir. Etkilenen sığırların tümü hastalığın yayılımında etkili değildir (11,12).

M. bovis'in özellikle pastörize edilmemiş süt ürünlerinin alınması yoluyla, ayrıca havadaki aerosoller ve deride oluşan hasarlar yoluyla insanlara nakledilebilir. Çiğ veya tam pişmemiş et ürünleri de organizmanın kaynağı olabilir (11). Hastalığa karşı bağışık duruma gelmiş insanlar arasında etkenlerin yayılması pek gözlenmez, ancak immun sistemi baskı altında olan (HIV pozitif) insanlarda ve alkol tüketenlerde etkenlerin bulaşması mümkün olabilir. İnsanlar çok az oranda da olsa hastalıklı sığırların aerosollerini ve idrarları aracılığı ile hastalığa yakalanabilirler (13).

Tüberkülozis sığırlarda genellikle kronik zayıflatıcı bir süreç izler. Ancak arada sırada da hastalık hızla ilerleyerek akut şekilde gelişim gösterebilir. Hastalığa özgü belirtilerin şekillenmesi ve saptanabilmesi için genellikle uzun zamanlar gereklidir. Genellikle hastalık yıllarca gizli seyrederek ve değişik durumlara bağlı olarak (yaşlılık veya stres gibi) yeniden aktive olabilir (9).

Hastalığın başlangıç dönemleri genellikle gizli seyrederek. Enfeksiyonun ilerlediği dönemlerde ise yaygın klinik semptomlar arasında zayıflık, yüksek olmayan dalgali ateş, takatsızlık ve iştah azalması yer alır. Akciğerlerin etkilendiği hastalık vakalarında özellikle sabah saatlerinde veya soğuk havalardaki egzersizler esnasında kötüleşen balgamlı öksürük, solunum güçlüğü ve solunum frekansında artışlar saptanabilir. Hastalığın iyice ilerlediği dönemlerde ise hastalarda ileri derecede zayıflama ve solunum stresi geliştiği saptanabilir. Bazı vakalarda retrofarengeal veya diğer lenf yumrularında büyüme fiziki muayenede belirlenebilir. Büyümüş olan lenf yumrularının yapmış olduğu baskıya bağlı olarak kan damarları, solunum yolları veya sindirim kanalı etkilenebilir. Özellikle sindirim kanalı bu baskıdan etkilenirse aralıklı ishal veya konstipasyon gözlemlenebilir (11,14).

Sığır tüberkülozu başlıca etkenlerin yerleştiği granulomların (tüberkel) oluşumuyla karakterizedir. Bu granulomlar genel olarak sarımsı renkte olup, ya kazeöz, kazeo-kalkaroz ya da kalsifiye özelliktedir. Lezyonlar genellikle kapsüllenmiş olup, geyik gibi bazı türlerde tipik tüberküllerden ziyade apseler benzemektedir. Bazı vakalarda tüberküller çok küçük olup çıplak gözle görülemeyebilirler (9).

Sığırlarda hastalığın karakteristiği olan tüberkeller özellikle baş ve toraks bölgesindeki lenf bezlerinde gelişir. Bu tip lezyonlara aynı zamanda akciğerler, dalak, karaciğer ve vücut boşluklarının yüzeylelerinde de rastlanılabilir. Hastalığın birçok sisteme yayıldığı vakalarda çok sayıda küçük granulomlar organlarda bulunabilir. Hastalıkla alakalı lezyonlar bazen dişi üreme organlarında saptanabilmekle beraber, erkek hayvanlarda nadiren ortaya çıkarlar. Hastalıkla ilgili olarak sıkı kontrol programlarının uygulandığı bölgelerde hastalıktan ölen sığırların nekropsilerinde oldukça az miktarda tipik hastalık lezyonuna rastlanır ve bu lezyonlar büyük oranda solunum sistemiyle ilgili lenf yumrularına yerleşmiştir (6,7,10).

Hastalığa yakalanan sığırların çoğunluğu klinik olarak normal görünüştedir. Yaygın milier tüberküloz lezyonlarına sahip bazı sığırlar dahi klinik olarak normaldirler. Özellikle diğer bulgularla alakalı olmayan ileri derecedeki zayıflama hastalık şüphesini artırır (14). Dalgalı ateş durumu da çoğunlukla hastalıkla ilişkilidir (14,15). Oluşan akciğer tüberkülozu solunum güçlüğü ve hafif pnömoni semptomları ile birlikte, kronik seyirli öksürükle karakterizedir (14). Hastalığa yakalanan hayvanlar pek hareket etmezler (16). Hastalığı uzun süre taşıyan sığırların nekropsilerinde ise primer lezyonların akciğerler ve ilişkili olduğu lenf yumrularında saptandığı belirtilmektedir (17).

Sığırlarda enfeksiyon genellikle sadece hastalığın ilerlemiş evrelerinde klinik olarak teşhis edilebilmektedir. Tüberkülin deri testi hastalığın ilk dönemlerinde kullanılan bir testtir. Bunun yanı sıra, hastalığın pek görülmediği veya değişik kontrol programları nedeniyle hastalıktan arındırılmış bölgelerde et muayenesi yapılarak ta hastalık teşhis edilebilir (14).

Tüberküloz yalnızca fiziksel klinik muayeneler dikkate alındığında saptanabilmesi zor olan bir hastalıktır. Çoğu olay pratikte kullanılan tarama testleri veya mezbahalarda vakaların dikkati çekmesiyle ortaya konur. Histopatolojik olarak veya asido rezistans bakterilerin mikroskopik olarak ortaya konmasıyla da ihtimali teşhis konabilir. Klinik örnekler veya dokulardan alınan direk yaymalar özel boyalarla (Ziehl/Nielsen) boyanabilir. Teşhisi doğrulamak adına spesifik kültür ortamlarında *M. bovis*'in izolasyonu gereklidir. Bunun yanı sıra PCR yöntemi ile elde edilen örneklerde doğrudan etken belirlenebilir. Son zamanlarda lenfosit proliferasyonu ve gamma interferon testleri hücrel bağışıklığı ölçen kan testleri olarak uygulamada yerini almaya başlamıştır. Bunlardan lenfosit proliferasyon testi sığırlarda pek kullanılmamaktadır (9,18-20).

Dünyada sığırlardaki tüberkülozun teşhisinde standart uygulama yöntemi deri içi tüberkülin testidir. Bu yöntem ülkemiz dahil birçok ülkede saha şartlarındaki tüberküloz vakalarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (21). Deri içi tüberkülin testi basit ve pahalı olmayan bir yöntemdir. Testin uygulanmasıyla ilgili bazı değişimler olmasına rağmen yaklaşık 100 yıldır testin prensibi değişmemiştir (22). Ülkemiz dahil bir çok ülkede *Mycobacterium bovis* AN5 kültüründen hazırlanan purifiye protein derivatı (PPD) deri içi tüberkülin testi amacıyla kullanılmaktadır. Bu suş 1948 yılında İngiltere'deki saha suşundan izole edilmiştir (23). Deri içi tüberkülin testi hastalığa karşı oluşan hücrel duyarlılığı ortaya çıkarmak için yapılmakta ve hücreye bağlı gelişen aşırı duyarlılık reaksiyonları içerisinde yer almaktadır (24). Deri içi tüberkülin testi uygulanırken 0.1 ml PPD mamalian tüberkülin deri içi yolla verilir. Deri içi uygulama genel olarak boyun veya kuyruk bölgesi

derisinden yapılmasına rağmen, boyun bölgesi derisi tüberkulin testine çok daha duyarlıdır (25). Bu test sadece sığır tüberkulinini veya hem avian ve hem de sığır tüberkulinleri kullanılarak karşılaştırmalı şekilde uygulanabilir (9). Deri içi uygulamadan sonraki 72 saat içerisinde uygulama bölgesindeki gecikmiş tip aşırı duyarlılığın göstergesi olarak deri şişkinliği artar ve bu şişkinlik ölçülerek değerlendirme yapılır (26-28). Uygulama bölgesindeki yaygın şişkinlik pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir ve bu bulgu enjeksiyon bölgesine monositik hücreler ile duyarlı T-lenfositlerin geçişiyle alakalı gecikmiş tip hipersensitiviteye yorumlanır (25-27).

Bununla birlikte deri içi tüberkulin uygulamasında da yanlış pozitiflik ve negatiflik durumlarıyla karşılaşılabilir. Bu test yeterince spesifite ve duyarlılığa sahip değildir (24). Yeni doğum yapmış olan hayvanlarda da test sonuçları hatalı değerlendirmelere neden olabilir (29-32). Özellikle bir sürüde hastalar varsa ve bu hayvanlarla temas olduğundan şüpheleniliyorsa testin kullanılması pek tavsiye edilmez. Şayet uygulanırsa yanlış negatif sonuçlar ve testin duyarlılığında azalma meydana gelebilir. Eğer teşhis amacıyla sadece tek bir tüberkulin testi yapılırsa gerçek anlamlı eradikasyon zor olur, çünkü hastalığın erken safhasında ve ileri derecede hasta hayvanlarda yanlış negatif sonuçlar meydana gelebilir (9).

Deri içi tüberkulin testinin belli bazı olumsuzlukları nedeniyle hastalığın teşhisinde bu testin yanı sıra, gerek elde edilen sonuçları doğrulamak gerekse olası hataları düzeltmek için bazı yardımcı kan testleri de kullanılmaktadır (9). Enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA) ve gama-interferon (IFN- γ) testi gibi testler son yıllarda hastalığı saptamada kullanılmaktadırlar (12). Bununla

birlikte sığır veya diğerk hayvanlarda tüberküloz için yaygın olarak kabul gören diagnostik kan testi bulunmamaktadır. Hastalığın belirlenmesinde genellikle M. bovis'in izolasyon ve identifikasyonuna güvenilmektedir. Aynı zamanda humoral bağışıklık testleri de sığırlarda sınırlı kullanım imkanına sahiptir. Çünkü hastalık esnasındaki titreler tutarsızlık göstererek sadece hastalığın son dönemlerinde yükselmektedir (9).

Sığır tüberkülozunda en etkili kontrol stratejisi hasta hayvanların belirlenmesi ve sürüden uzaklaştırılmasıdır. Bu açıdan enfeksiyonun erken dönemlerde tanınması çok önemlidir. Antikor yanıtı gelişiminden önce genellikle hücresel immun yanıtlar saptanabilir (33). Deri içi tüberkülin testinin uygulanması ve test sonucu pozitif olan hayvanların sürüden çıkartılması Avustralya, birçok Avrupa ülkesi, Kanada ve Amerika'nın birçok bölgesinde uygulanmaktadır (34).

Gelişmiş ülkelerde eradikasyon programları ile sığırlardaki hastalık vakaları azaltılmış ve insanlardaki vakalar nadir gözlenmeye başlanmıştır. Ancak vahşi yaşamdaki rezervuarlar hastalığın tamamen eradikasyonunu zorlaştırmaktadır. Daha az gelişmiş ülkelerde ise hastalık halen yaygın olup, çiftlik hayvanları arasında önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (35).

3.2. Reaktif Oksijen Türleri ve Neden Oldukları Bozukluklar

Reaktif oksijen Türleri (ROS), dış katmanlarında serbest halde en az bir veya daha çok sayıda eşleşmemiş elektron bulunduran, reaktif özellikteki atom veya moleküllerdir (36-39). ROS organizmada fizyolojik metabolik reaksiyonların mutlak yan ürünleridir. Organizmada bu tür fonksiyonlar sırasında oluşmalarının

yanı sıra, değişik eksternal faktörler nedeniyle de (çevre kirliliği, ilaçlar, radyasyon, vs) ortaya çıkabilirler. Bu tür radikallerin ortamda bulunma süreleri çok kısa olmasına rağmen, çok reaktif bir yapıya sahip olmalarından dolayı bir çok biyomolekülle kolayca reaksiyona girerek birtakım seri reaksiyonların başlamasına neden olurlar. Ortaya çıkan ROS'ların organizmada damar hastalıkları, dejeneratif nörolojik hastalıklar, hipertansiyon, böbrek hastalıkları, pulmonel, deri ve otoimmün hastalıklar ile göz hastalıklarının ortaya çıkışıyla alakalı oldukları bulunmuştur (40).

ROS içerisinde en aktif olanı ve organizmadaki yapılarla reaksiyona girerek en fazla zarar verici etki oluşturanı hidroksil (OH^\cdot) radikalidir (41). Oluşan diğer radikallerden süperoksit (O_2^\cdot) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) radikalleri ise hidroksil radikaline göre daha az zarar verici özelliktedir. Süperoksit radikali meydana geldiği bölümlerde lipit zarlara nüfus etme yeteneğinde olmadığı için oluştuğu kısımlarda tutulur. Ortamlarda bulunan süperoksit radikalleri süper oksit dismutaz (SOD) adı verilen bir enzimle reaksiyona girerek hızla hidrojen peroksite (H_2O_2)'e dönüşürler (42).

ROS'larla reaksiyona giren atom veya moleküller bu reaksiyon sırasında bir elektronunu kaybettiklerinden dolayı, çevrelerindeki moleküllerden eksik kalan bir elektronunu alacak derecede reaktif duruma gelirler. Bu sebeplerden dolayı ROS'lar zincir reaksiyonu şeklinde çoğalmaya devam ederler (43). Bu tür zincirleme devam eden reaksiyonların sonlandırılması ve eşleşmemiş haldeki elektronunun ortadan kaldırılmasında, ya oluşan radikal bir başka radikalle ya da ROS etkisini ortadan kaldıran zincir kıran bir antioksidanla reaksiyona girmelidir (44). Normal şartlarda vücutta oluşan ROS düzeyleri ile bunları etkisizleştiren

antioksidan yapılar denge halinde olup, ROS'ların olumsuz etkileri bu antioksidan yapılar tarafından kontrol altında tutulur (44,45).

3.3. Lipit Peroksidasyonu (LPO)

LPO, organizmada oluşan ROS'ların özellikle hücre zarlarındaki doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girmesi sonucunda bir takım yan ürünlere (peroksit, alkol, aldehid, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi) yıkımlanması olayıdır. Bu yıkımlanma süreci başladıktan sonra kendi kendini katalizleyerek birbirini takip eden zincir reaksiyonları şeklinde devam eder. Serbest ROS'ların dokularda meydana getirdiği en önemli hasar LPO'dur. Bu reaksiyonların son aşamasında üç ve daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu toksik bir ürün olan malondialdehid (MDA) oluşur ki, MDA düzeyleri LPO'un göstergesi olarak kabul edilir (46).

3.4. Antioksidan Sistemler

Organizma çok çeşitli etkenler sonucu ortaya çıkan ROS'ların meydana getirebileceği olumsuzluklardan, sahip olduğu antioksidan sistemler aracılığıyla korunmaktadır (45). Antioksidasyon ifadesi ROS'ların oluşumunu geciktiren veya meydana gelen radikallerin etkisizleştirildiği işlemlere verilen isimdir. ROS'ların etkisizleştirilmesinde etkili olan, organizmanın sahip olduğu bu sistemin temel iki özelliği olup, birincisi ROS'larla kısa sürede reaksiyona girerek yeni bir radikal oluşturması, ikincisi ise oluşan yeni radikale reaktif olmayan özellik kazandırmasıdır (38).

Organizmada mevcut olan bu savunma sistemleri değişik radikal tutucuları ile bazı enzimlerden oluşmaktadır. Süperoksit dismutaz, katalaz ve glutathion peroksidaz oluşan ROS'ların ortamlarda çoğalmasını ve LPO'nun başlamasını önleyen önemli enzimlerdir. Mevcut enzim sisteminin ROS'ları etkisizleştirmede yetersiz kaldığı durumlarda ise düşük molekül ağırlıklı ve enzimsel özellikte olmayan serbest radikal tutucuları zincir reaksiyonlarının ilerlemesini önlemeye çalışırlar. Bu sistem içerisinde de tokoferoller, karotenler, askorbik asit ve glutatyon yer almaktadır (39,45).

Süperoksit dismutaz enzimi süperoksit radikalini, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene ayırır (47). Katalaz hidrojen peroksidin oksijen ve suya ayrışmasını sağlar ve özellikle hidrojen peroksidin su ve moleküler oksijene katalizlendiği yer olan peroksidomlarda bulunur (44). Glutathion peroksidaz, hidroperoksidlerin alkollere indirgenmesini sağlayarak hidroksil radikallerinin meydana gelişini azaltır. Glutathion peroksidaz enzimi organizmada eritrositlerin içerisinde yer alır ve hidroperoksidlerin hemoglobini methemoglobine dönüştürmesini önleyen sistemin önemli bir parçasıdır. Bu enzim hücre membranlarındaki lipit peroksidleri zarar verici etkileri ortaya çıkmadan önce yıkımlayan bir enzimdir (48).

Enzimsel olmayan antioksidan sistem içerisinde yer alan E vitamini, organizmanın sahip olduğu mükemmel bir doğal antioksidandır. Vitamin E'nin aktif formu ve antioksidan özelliği en fazla olanı α -tocopheroldür. E vitamininin antioksidan özelliği yapısında buluna fenolik hidroksil grubundan kaynaklanır (49-51).

E vitamini oldukça etkili bir antioksidan özelliğe sahip olup, hücre zarındaki mevcut fosfolipid tabakadaki doymamış yağ asitlerinin ROS'un (süperoksit, lipid peroksit, hidroksil, singlet oksijen) zararlı etkisinden korunmasında oldukça etkilidir (52, 53). Vücudun sahip olduğu enzimsel olmayan antioksidan sistem içerisinde, E vitamini çok daha fazla bulunduğundan dolayı plazma ve düşük moleküllü lipoproteinlerdeki en önemli antioksidan olarak kabul edilmektedir (48,54). E vitamini ile bir antioksidan enzim olan glutasyon peroksidaz arasında ROS etkilerine karşı sinerjik etki mevcuttur. Bu etki içerisinde glutation peroksidaz enzimi peroksitleri ortadan kaldırırken, E vitamini peroksitlerin sentezini engellemektedir (53). E vitaminin antioksidan etkisinde sahip olduğu fenolik grubu (TOH) ortamdaki peroksil radikali (ROO[•]) ile reaksiyona girerek, hidrojen atomunu peroksil radikaline geçirir ve sonuç olarak bir α -tocopheroxyl radikali (TO[•]) meydana gelir (38,47). Meydana gelen bu radikal ise glukoronik asitle konjuge edilerek safra yoluyla atılır (48). Böylece peroksil radikallerinin hücre zarlarındaki doymamış yağ asitleriyle reaksiyonu önlenmiş olur ve zincir reaksiyonlarının yayılması durdurulur (55). Ayrıca E vitamininin nötrofil aktivitesini, prostoglandin sentezini ve hücresel/humoral bağışıklığı güçlendirdiği ifade edilmektedir (51,56).

Vücutta bulunan ve enzimsel olmayan antioksidan sistemin diğer önemli bir üyesi ise vitamin C'dir. Bu vitamin hücre dışı sıvılardaki en etkili antioksidandır. Askorbik asitin ortamdaki birçok ROS türünü (süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil, peroksil, vs) etkili şekilde ortadan kaldırdığı ifade edilmektedir (57,58). Bu önemli etki içerisinde vitamin C'nin iki özelliği oldukça önemli olup, birincisi oluşan ROS türleri ile etkili şekilde reaksiyona girmesi ve bu etkileşimde

oluşan askorbil radikalinin düşük etkinliğe sahip olması, ikincisi ise ortaya çıkan yeni ürünün kolayca askorbat ve dehidroaskorbik asite ayrışabilmesidir (59). Bunun yanı sıra vitamin C'nin antioksidan etkide tokoferollere yardımcı olduğu ve oluşan tokoferoksil radikalinden bir oksijen atomunu alarak bu ürünü yeniden aktif tokoferol haline dönüştürdüğü ileri sürülmektedir. Vitamin C'nin bu etkisi sonucunda, tokoferollerin ROS'ları etkisizleştirme özelliği de yenilenmiş olur (51). Bu reaksiyon sırasında oluşan yeni ancak etkisi az olan radikal (askorbil radikali) tekrardan okside olmaz (38).

Bu grup içerisinde yer alan antioksidanlardan bir diğeri olan karotenler yağda çözünen antioksidanların değişik bir tipidirler. Beta karotenin antioksidan etkisi reaksiyona girdiği alkil yapı içinde bulunan karbon merkezli radikalleri stabilize etme yeteneğinden kaynaklanır. Karotenler düşük oksijen konsantrasyonlarında etkili olduklarından, yüksek oksijen konsantrasyonlarında etkili olan vitamin E'nin antioksidan etkisine katkıda bulunurlar (48).

Bu çalışma, ülkemizdeki sığırlarda da görülen tüberküloz hastalığında antioksidan parametrelerdeki değişimi belirlemek amacıyla yapılmıştır.

4. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Erzincan yöresinde bulunan Türkvat Kayıt Sistemine kayıtlı işletmelerden (A,B,C,D,E,F) sağlanan ve Prufiye Protein Derivati (PPD) mammalian tüberkülin testine pozitif yanıt veren 15 adet tüberkülozli inek ile, PPD mammalian tüberkülin testine negatif yanıt veren 15 inekten oluşan, çeşitli yaş gruplarındaki (4 – 7 yaş) toplam 30 adet inek üzerinde yürütülmüştür.

PPD mammalian tüberkülin testinde, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından üretilen *Mycobacterium bovis*'in üreme ve lizis ürünlerinin ısı ile işlem görmesi ile elde edilen ve aynı türden mikroorganizmalara karşı hassas hale getirilen bir hayvanda gecikmiş tip hipersensitivite oluşturma yeteneğine sahip 3ml'lik Etlik Bovine Tüberkülin PPD mammalian preparatı kullanılmıştır (Şekil 1). Bakanlıkça belirlenen yönetmeliğe göre sığır için enjekte edilecek tüberkülin 2000 UI'den az olamaz, her bir enjeksiyon dozu 0,2 ml'yi geçemez. Buradan hareketle, boynun orta üçte birlik kısmının sol tarafındaki kıllar kırılmış ve temizlenmiştir. Kırılan bölge bir deri kıvrımı yapılarak kompas ile ölçülüp kaydedilmiş ve PPD mammalian tüberkülin deri içi olarak 0,1 ml dozunda temizlenen bölgeye enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan 72 saat (\pm 4 saat) sonra her bir enjeksiyon bölgesinin kalınlığı ölçülerek yeniden kayıt edilmiştir. Bakanlıkça belirlenen yönetmeliğe göre değerlendirme yapılarak tüberküloz yönünden pozitif ve negatif hayvanlar belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan pozitif kan örnekleri tek tüberkülin uygulamasından 72 saat sonra kompasla ölçülen deri kalınlığı 4 mm'den kalın olan hayvanlardan alınan örneklerden oluşmaktadır. Kontrol grubunu oluşturan

kan örnekleri ise tüberkülin uygulamasından 72 saat sonra kompasla ölçülen deri kalınlığı 2 mm'den fazla olmayan hayvanlardan alınan örneklerden oluşmaktadır. Pozitif test örneklerinin alındığı işletmeler ve alınan örnek sayıları şu şekildedir: A (TR241845) işletmesinden 1, B (TR243557) işletmesinden 2, C (TR244316) işletmesinden 4, D (TR245088) işletmesinden 3, E (TR24246538) işletmesinden 1 ve F (TR24491) işletmesinden 4 pozitif örnek alınmıştır. Kontrol grubu serumlar ise yine Erzincan yöresinde Türkvvet kayıt sistemine kayıtlı aynı işletmelerden (A,B,C,D,E,F) PPD mamalian tüberkülin testi bakanlıkça belirlenen yönetmeliğe göre negatif olan hayvanlardan alınmıştır.

Hem çalışma hem de kontrol grubundaki hayvanların V. jugularislerinden antikoagulanlı ve antikoagulansız tüplere kan örnekleri alınmış, 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra örnekler epandorf tüplere alınarak -20 °C'de dondurularak en kısa sürede analizleri yaptırılmıştır. Ayrıca plazmalar alındıktan sonra geriye kalan eritrosit kısmı 3 kez % 0.9'luk NaCl çözeltisiyle yıkanarak, 1 kısım eritrosit süspansiyonu 9 kısım distile su ile karıştırılmış, sonunda % 10'luk eritrosit hemolizatı elde edilerek hemolizat glutatyon peroksidaz belirlenmesinde kullanılmıştır.

Şekil 1. Deri içi tüberkülin testinde kullanılan kompas, enjektör ve PPD mamalian preparatı.



Lipid peroksidasyonu (MDA) tayini Placer ve ark. (60)'nın tanımladığı yönteme göre spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Prensip: pH'ın 3,4 olduğu aerobik bir ortamda TBA ile plazmanın 100 °C'de inkubasyonu, lipid peroksidasyonun sekonder bir ürünü olan Malondialdehiti (MDA) oluşturmaktadır. Oluşan MDA, TBA ile pembe renkli bir kompleks oluşturur. Pembe rengin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü ile lipid peroksidasyon saptanır. Belirlenen absorbans değeri MDA standart eğrisinden yada yine standart eğriden hesaplanan 0,0092 sabit rakamına bölünerek plazma MDA değeri nmol/ml olarak hesaplanmıştır.

GSH-Px tayini: Hemolizatta GSH-Px aktivitesi Lawrence ve ark. (61)'nin belirttiği şekilde belirlenmiştir. Hemolizatta GSH-Px, GSH Cumene hidroperoksit (CHPO₄) ile oksidasyona uğratılmıştır. Renk ajanı olarak 5,5-ditiyo-bis[2-nitrobenzoik asit] (DTNB) solusyonu ile karıştırılması sonucu hem kör ve hem de

örneklerde meydana gelen sarı renk kompleksinin 412 nm’de spektrofotometre ile okunması sonucu belirlenmiştir.

GSH tayininde Sedlak (62)’ın, katalaz enzim aktivitesinin tayininde ise Goth (63)’un tanımladığı yöntem kullanılmıştır.

Antioksidan vitaminlerden olan vitamin E ile vitamin A düzeyleri F.Ü. Merkez Laboratuvarında tekniğine uygun olarak ticari test kitleri yardımıyla HPLC cihazında belirlenmiştir. Vitamin C düzeyleri ise F.Ü. Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları ABD Laboratuvarında fosfotungstik asit metodu kullanılarak kolorimetrik olarak tekniğine uygun yöntemle (64) belirlenmiştir.

Çalışmada elde edilen sonuçlar vitamin E hariç normal dağılım göstermiştir. Gruplarda normal dağılımı bozan bireyler olduğundan istatistiksel analizlerde SPSS Ms Windows Release 20.0 programında nonparametrik “Mann-Whitney U testi” kullanılmıştır.

5. BULGULAR

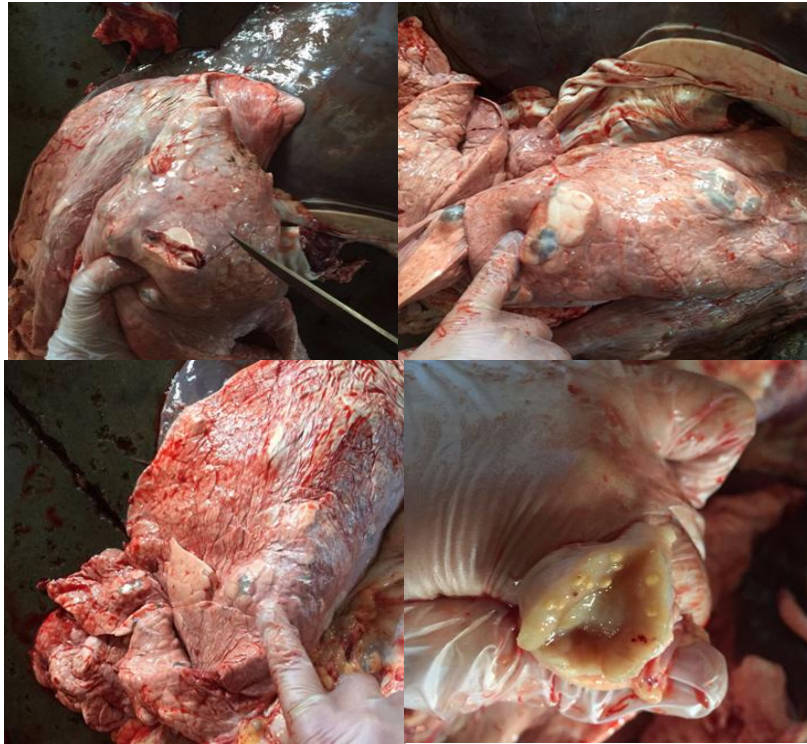
Çalışmada deri içi PPD mamalian tüberkulin testi uygulanan hayvanlarda pozitif deri kalınlaşmaları Şekil 2’de, ayrıca tüberkuloz hastalığı yonunden pozitif olan ve ilgili yonetmelik gereğince kesime sevk edilen hastalara ait kesim sonrası organlarda saptanan lezyonlarda Resim 3’te sunulmuştur.



Şekil 2 . PPD mamalian tüberkulin uygulandıktan 72 saat sonra saptanan pozitif deri reaksiyonları.



Şekil 3. Tüberküloz saptanan sığırların organlarındaki lezyonlar.



Gerek tüberküloz yönünden pozitif, gerekse de negatif saptanan ineklerde belirlenen oksidan ve antioksidan parametrelerin ortalama değerleri ile istatistiksel önem dereceleri ise Tablo 1’de toplu şekilde sunulmuştur. Bu tablo incelendiğinde; gruplar arasında MDA (P<0.01), GSHPx (P<0.01), GSH (P<0.05), vitamin E (P<0.001) ve vitamin C (P<0.01) bakımından istatistiksel önem olduğu, katalaz ve vitamin A yönünden ise her ne kadar tüberkülozisli sığırlarda değerler düşük belirlense de, istatistiksel bir önem saptanmadığı görülmektedir.

Tablo 1 : Tüberküloz yönünden pozitif ve negatif saptanan ineklerde oksidan ve antioksidan parametrelerin ortalama değerleri ile istatistiksel önem dereceleri.

Parametreler	Tüberküloz Negatif (n=15)	Tüberküloz Pozitif (n=15)	P
MDA (nmol/ml)	2.91 ± 0.48	3.68 ± 0.44	**
GSHPx (IU/L)	27.98 ± 9.33	19.88 ± 8.94	**
CAT (kU/L)	94.36 ± 17.90	93.36 ± 20.95	-
GSH (nmol/ml)	0.22 ± 0.67	0.16 ± 0.30	*
Vitamin E (mg/L)	8.13 ± 2.66	2.72 ± 0.76	***
Vitamin C (mg/L)	7.39 ± 0.76 ^a	5.84 ± 0.94	**
Vitamin A (mg/L)	0.49 ± 0.51	0.46 ± 0.16	-

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

*: P<0.05, **: P<0.01, ***:P<0.001, -: önem yok

6. TARTIŞMA

Sığır tüberkülozu birçok ülkede ekonomik açıdan önemli başlıca sağlık problemidir. Tahminen dünyada 50 milyona yakın sığırın tüberkülozun etkeni olan *M. bovis* ile enfekte olduğu düşünülmektedir (65). Deri içi tüberkülin testi hem insanlarda hem de veteriner sahada çok sayıda *mycobacterium* türünün neden olduğu hastalığın teşhisinde kullanılan klasik testlerden biridir. Yaşayan hayvanlarda hastalığın teşhisinde ayrıca IFN- γ testleri de günümüzde kullanılmaktadır (66-68).

Deri içi tüberkülin testi ülkemiz dahil birçok ülkede saha şartlarında tüberkülozun teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (21). Deri içi tüberkülin testi basit, pahalı olmayan ve yaygın olarak kullanılan bir test olup, yaklaşık 100 yıldır prensibi değişmemiştir (22). Deri içi tüberkülin testinde 0.1 ml PPD mamalian tüberkülin deri içi yolla uygulanır. Uygulama genel olarak boyun veya kuyruk bölgesi derisinden yapılmasına rağmen, boyun bölgesi derisi tüberkülin testine çok daha duyarlıdır (25). Uygulama sonrası 72 saat içerisinde uygulama bölgesindeki gecikmiş aşırı duyarlılığın göstergesi olan deri şişkinliği ölçülerek değerlendirme yapılır (26-28). Uygulama bölgesindeki diffuz şişkinlik pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir ve bu şişkinlik inokulasyon bölgesine monositik hücreler ve duyarlı T lenfositlerin geçişiyle alakalı gecikmiş tip hipersensitiviteye işarettir (25-27).

Mevcut çalışmada Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından üretilen *Mycobacterium bovis*'in üreme ve lizis ürünlerinin ısı ile işlem görmesi ile elde edilen ve aynı türden

mikroorganizmalara karşı hassas hale getirilen bir hayvanda gecikmiş tip hipersensitivite oluşturma yeteneğine sahip 3ml'lik Etlik Bovine Tüberkülin PPD mamalian preparatı kullanılarak deri içine 0,1 ml dozunda PPD mamalian tüberkülin enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan 72 saat (\pm 4 saat) sonra her bir enjeksiyon bölgesinin kalınlığı ölçülerek deri kalınlığı 4 mm'den kalın olan hayvanlar tüberküloz hastalığı yönünden pozitif kabul edilirken, deri kalınlığı 2 mm'den fazla olmayan hayvanlar hastalık yönünden negatif kabul edilmişlerdir.

Hastalık bu kadar önemli olmasına rağmen, erken dönemde hastalığa işaret edecek tipik semptomlar sıklıkla belirsizdir. Ancak hastalığın ilerlediği son dönemlerine doğru organ ve sistemlere ait bulgular dikkati çekmeye başlamaktadır (69).

ROS'ların aşırı üretilmesi ve savunmanın yetersiz kalması sonucu gelişen oksidatif stres durumu, şekillenen bazı hastalıklarda ikincil olarak etkiyerek mevcut hastalığın ilerlemesine neden olan ilave bir faktör olarak etki etmektedir. Böylesi bir durumda yani antioksidan savunma sisteminin yetersiz kaldığı durumlarda değişik tipteki hastalıklar veya klinik semptomları ortaya çıkabilmektedir (70-72). Başlıca doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu esasına dayanan lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehid (MDA) düzeylerinin belirlenmesi, organizmada oksidatif stresin gelişip gelişmediğinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir metoddur (73-75). Lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan değişik yan ürünler hücre membranının yapısını olumsuz etkiler (76,77). Özellikle eritrosit membranı doymamış yağ asitlerini bünyesinde fazlaca bulundurur ve lipid peroksidasyona karşı oldukça duyarlıdır (78-80).

Mevcut çalışmada, tüberkülozisli sığırlarda hastalık esnasında oksidatif parametrelerde ne gibi bir değişim olduğu araştırılmıştır. Bu araştırma sonucunda tüberkülozisli sığırlarda kontrollere nazaran saptanan yüksek MDA düzeyleri hastalık esnasında gelişen oksidatif stresin göstergesi olarak kabul edilmiştir. Çalışmada tüberkülozisli sığırlarda katalaz düzeylerinde kontrollere nazaran düşük değerler saptanmış olmasına rağmen, bu azalmalar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Oysa GSHPx ve GSH düzeylerinde gruplar arasında önemli azalmalar tespit edilmiştir. Her ne kadar katalaz düzeylerindeki azalmalar önemli bulunmamış olsa da, bu enzim düzeyi ile GSHPx ve GSH düzeylerindeki tüberkülozisli sığırlarda saptanan azalmaların hastalık esnasında gelişen oksidatif strese bağlı olarak ortaya çıkan radikalleri etkisizleştirmek adına kullanımlarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu çalışma planlanmadan önce yapılan araştırmalarda tüberkülozisli sığırlarda oksidatif stres durumunun belirlendiği bir başka çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu konuda insanlar üzerinde yürütülen değişik çalışmalar mevcut olup, bu çalışmalarda MDA düzeylerinde artış, glutatyon ve katalaz düzeylerinde azalma (81-82) ile vitamin E ve vitamin C düzeylerinde azalmalar (83) saptanmıştır.

Vitamin E vücutta özellikle lipoprotein yapılar ve hücre zarlarında mevcut olan yağda eriyen en önemli antioksidanlardan biridir (73,84,85). Askorbik asit ise organizmadaki biyolojik sıvılarda bulunan ve suda çözünen zincir kıran antioksidan olarak görev yapar ve lipid bölgelerindeki radikallere etkisi yoktur (86). Lipid peroksidasyonun önlenmesinde askorbik asit ile α -tocopherol arasındaki sinerjizm oldukça iyi bilinmektedir. Vitamin C, vitamin E'nin

antioksidan etkisini artırırken, aynı zamanda tüketimini de azaltmaktadır (84,87,88).

Normal şartlarda erişkin sığırların karaciğeri tarafından askorbik asit sentezlenebilmekte ve bu sentez fizyolojik ihtiyaçlar için yeterli olmaktadır (89,90). Yine de ruminantlar, askorbik asitin rumen mikroflorası tarafından yıkımlanması nedeniyle eksikliklere karşı duyarlıdırlar. Askorbik asit yetersizliği de vücudun enfeksiyonlara karşı savunma gücünü azaltmaktadır (91).

Mevcut çalışmada tüberkülozisli sığırlarda kontrollerle karşılaştırıldığında vitamin E ve C düzeylerinin önemli derecede azalmış olduğu dikkati çekmektedir. Bu durumun nedeninin hem hastalık esnasında gelişmesi muhtemel olan yem tüketimi azalması hem de gelişen oksidatif strese bağlı artan kullanımlarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Vitamin A düzeyleri açısından ise gruplar arasında istatistiksel önem saptanmamıştır. Bu durum gelişen oksidatif stres esnasında öncelikle E ve C gibi vitaminlerin kullanımıyla alakalı olabilir.

Sonuç olarak tüberkülozisli sığırlarda lipid peroksidasyon ve antioksidan parametrelerde önemli değişimler belirlenmiştir. Klinik olarak önemli ve hastalığa işaret edebilecek bulguların yetersizliği nedeniyle, özellikle şüpheli durumlarda oksidatif stres parametrelerindeki değişimlerin belirlenmesinin bu açıdan teşhise yardımcı bir kriter olarak dikkate alınabileceği sonucuna varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Bergey DH, Holt JG, Krieg NAR, Sneath PHA. The mycobacteria. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 1994.
2. Hussain T. Leprosy and tuberculosis: an insight-review. Crit Rev Microbiol 2007; 33(1): 15-66.
3. Behr MA. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. Vaccine 2001; 17: 915–922.
4. Van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas PE, et al. A novel pathogenic taxon of the Mycobacterium tuberculosis complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. Int J Syst Bacteriol 1997; 47(4): 1236-1245.
5. Aranaz A, Liebana E, Gomez-Mampaso E, et al. Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae subsp. nov: a taxonomic study of a new member of the Mycobacterium tuberculosis complex isolated from goats in Spain. Int J Syst Bacteriol 1999; 49: 1263-1273.
6. O'Reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of Mycobacterium bovis infections in animals and man: a review. Tuber Lung Dis 1995; 76: 1-46.
7. Shitaye JE, Tsegaye W. Pavlik I. Bovine tuberculosis infection in animal and human populations in Ethiopia: a review. Vet Med 2007; 52(8): 317–332.

8. O'Reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man – a review. *Tubercle Lung Dis* 1995; 76 (Suppl. 1): 1–46.
9. Thacker TC, Lyashchenko KP, Waters WR. Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Trans Emerging Dis* 2010; 57(4): 205-220.
10. Pritchard DG. A century of bovine tuberculosis 1888-1988: Conquest and controversy. *J Comp Pathol* 1988; 99(4): 357-399.
11. Menzies FD, Neill SD. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet J* 2000; 160(2): 92-106.
12. Neill SD, Cassidy J, Hanna J, et al. Detection of *mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. *Vet Rec* 1994; 135(6): 134-135.
13. Une Y, Mori T. Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2007; 30(5-6): 415-425.
14. Ayele WY, Neill SD, Zinsstag J, Weiss MG, Pavlik I. Bovine tuberculosis an old disease but a new threat to Africa. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8: 1–14.
15. Fentahun T, Luke G. Diagnostic techniques of bovine tuberculosis: a review. *African J Basic Appl Sci* 2012; 4(6): 192-199.
16. Anonim. Zulfekar A. Bovine tuberculosis. file:///C:/Users/win7/Downloads/TB.pdf. 20.06.2016.
17. Stamp JT. Bovine pulmonary tuberculosis. *J Comp Pathol* 1948; 58: 9-23.

18. Neill SD, Skuce RA, Pollock JM. Tuberculosis--new light from an old window. *J Appl Microbiol* 2005; 98(6): 1261-1269.
19. Lima DM, Colares JK, da Fonseca BA. Combined use of the polymerase chain reaction and detection of adenosine deaminase activity on pleural fluid improves the rate of diagnosis of pleural tuberculosis. *Chest* 2003; 124(3): 909-914.
20. Kısa Ö, Tozkoparan E, Gümral R, ve ark. Tüberküloz Plörezi Tanısında Mikrobiyolojik Kültür Yöntemlerinin Değeri: 283 Olgunun Analizi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 2005; 35(2): 114-118.
21. Cousins DV. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev Sci Tech* 2001; 20: 71–85.
22. De La Rúa-Domenec R, Goodchild AT, Vordermeier HM, et al., Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci* 2006; 81: 190-210.
23. Inwald J, Hinds J, Palmer S, et al., Genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains used for the production of purified protein derivative. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3929–32.
24. Keskin O. Sığır tüberkülozisinin teşhisinde ELISA'nın kullanılması ve allerjik yöntemle karşılaştırılması, *Vet Hek Mikrobiyol Derg* 2001; 1(1): 11-18.
25. Anonim. "OIE, Bovine tuberculosis". http://web.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_1.11.6.pdf. 15.06.2016

26. Adam OW, Derek C, Bhagwati U, et al. Development of a Skin Test for Bovine Tuberculosis for Differentiating Infected from Vaccinated Animals J Clin Microbiol 2010; 48(9): 3176-3181.
27. Flores-Villalva S, Suárez-Güemesa F, Espitiab C. Specificity of the tuberculin skin test is modified by use of a protein cocktail containing ESAT-6 and CFP-10 in cattle naturally infected with Mycobacterium bovis. Clin Vaccine Immunol 2012; 19(5): 797-803.
28. Nathan CF, Brukner LH, Silverstein SC, Cohn ZA. Extracellular cytolysis by activated macrophages and granulocytes. Pharmacologic triggering of effector cells and the release of hydrogen peroxide. J Exp Med 1979; 149: 84-99.
29. Monaghan ML, Doherty ML, Collins JD, Kazda JF, Quinn PJ. The tuberculin test. Vet Microbiol 1994; 40: 111-124.
30. Drewe JA. Bovine tuberculosis: how likely is a skin test reactor to be uninfected? Vet Rec 2015; 12: 256-258.
31. Gareth JJ, Adam W, Derek C. Improved Skin Test for Differential Diagnosis of Bovine Tuberculosis by the Addition of Rv3020c-Derived Peptides. Clin Vaccine Immunol 2012; 19(4): 620–622.
32. Medley GF, Green LE. Enhancing the sensitivity of tests for bovine TB. Veterinary Record 2013; 172: 96-97.
33. Ritacco V, Lopez B, De Kantor IN, et al. Reciprocal cellular and immune responses in bovine tuberculosis. Res Vet Sci 1991; 50: 365-367.
34. Cousins DV. Mycobacterium bovis infection and control in domestic livestock. Rev Sci Tech 2001; 20: 71–85.

35. Tweddle NE, Livingstone P. Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zealand. *Vet Microbiol* 1994; 40: 23–29.
36. Bramley PM, Elmadfa I, Kafatos A, et al. Vitamin E (review). *J Sci Food Agric* 2000; 80: 913-938.
37. Miller JK, Slebodzinska EB. Oxidative stress, antioxidants and animal functions. *J Dairy Sci* 1993; 76: 2812-2823.
38. Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition* 2000; 16(7-8): 716-718.
39. Yalçın S. Serbest radikaller ve patolojik etkileri. *Sendrom* 1992; Ekim: 40-59.
40. Saikat S, Raja C, Sridhar C, Reddy YSR, Biplab D. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *Int J Pharma Sci Rev Res* 2010; 3(1): 91-100.
41. Haris LR, Cake MH, Macey DJ. Iron release from ferritin and its sensitivity to superoxide ions differs among vertebrates. *Biochem J* 1994; 301: 385-389.
42. Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, Cayota A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Rad Biol Med* 2001; 30: 463-488.
43. McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. Endothelial function in hypertension. *Hypertension* 1999; 34: 539-545.
44. Nordberg J, Arner ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Rad Biol Med* 2001; 31(11): 1287-1312.

45. Lanhance PA, Nakat ZBS, Woo-Sik JMS. Antioxidants: An integrative approach. *Nutr* 2001; 17; 835-838.
46. Köse K, Doğan P. Lipid peroksidasyonu. *Erciyes Tıp Derg* 1992; Ek1: 349-350.
47. Morrisey PA, O'Brien NM. Dietary antioxidants in health and disease. *Int Dairy J* 1998; 8: 463-472.
48. Arthur JR. The Gluthatione peroxidases. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 1825–1835.
49. Milad K, Racz O, Sipulova A, Bajova V, Kovac G. Effect of vitamin E and selenium on blood glutathione peroxidase activity and some immunological parameters in sheep. *Vet Med Czech* 2001; 46(1): 1-5.
50. Colombo ML. An Update on Vitamin E, Tocopherol and Tocotrienol Perspectives. *Molecules* 2010; 15: 2103-2113.
51. Pekiner BD. E vitamininin antioksidan rolü. *Ankara Ecz Fak Derg* 2003; 32 (4): 243-267.
52. Regina BF, Maret GT. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J* 1999; 13: 1145-1155.
53. Van Meeteren ME, Teunissen CE, Dijkstra CD, van Tol EAF. Antioxidants and polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis. *Europ J Clin Nutr* 2005; 59: 1347–1361.
54. Burton GW, Joyce A, Ingold KU. Is vitamin E only lipid-soluble, chain-breaking antioxidants in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arc Biochem Biophys* 1983; 221(1): 281-290.

55. Wilson RL. Vitamin, selenium, zinc and copper interactions in free radical protection against ill-placed iron. *Proc Nutr Soc* 1987; 46 (1): 27-34.
56. Nockels CF. Immunoenhancing vitamins for cattle. *Agri Pract* 1988; March-April: 10-17.
57. Carr A, Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J* 1999; 1008(13): 1007-1024.
58. Sies H, Stahl W, Alfred RS. Antioxidant function of vitamins; Vitamin E and C, Beta-carotene, and other carotenoids. *Ann NY Acad Sci* 1992; 669: 7-19.
59. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxydation, α -tocopherol, and ascorbate. *Arc Biochem Biophys* 1993; 300: 535-543.
60. Placer AZ, Linda LC, Johnson B. Estamination of product of lipid peroxidation (Malonyldialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem* 1966; 16: 359-364.
61. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71: 952-958.
62. Sedlak J, Lindsay RHC. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25: 192-205.
63. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta* 1991; 196: 143-152.
64. Kyaw A. A simple colorimetric method for ascorbic acid determination in blood plasma. *Clin Chim Acta* 1978; 16: 151-157.

65. Hope JC, Villarreal-Ramos B. Bovine TB and the development of new vaccines. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2007; 31: 77–100.
66. Ewer K, Deeks J, Alvarez L, et al. Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak. *Lancet* 2003; 361: 1168–1173.
67. Wood PR, Rothel JS. In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis *Vet Microbiol* 1994; 40: 125–135.
68. Ulrichs T, Munk ME, Mollenkopf H, et al. Differential T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6 in tuberculosis patients and healthy donors. *Eur J Immunol* 1998; 28: 3949–3958.
69. Ramosa DF, Silvab PEA, Dellagostina OA. Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques. *Braz J Biol* 2015; 75(4): 830-837.
70. Gutteridge JMC. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun* 1993; 19(3): 141-158.
71. Kızıl O, Ozdemir H, Karahan M, Kızıl M. Oxidative stress and alterations of antioxidant status in goats naturally infected with *Mycoplasma agalactia*. *Rev Med Vet* 2007; 158 (6): 326-330.
72. Kızıl O, Akar Y, Saat N, Kızıl M, Yüksel M. The plasma lipid peroxidation intensity and chain-breaking antioxidant concentrations in the cows with clinic or subclinic mastitis. *Rev Med Vet* 2007; 158 (11): 529-533.

- 73.** Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 1990; 15(4): 129-135.
- 74.** Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 2002; 30: 620-650.
- 75.** Moore K, Roberts LC. Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res* 1998; 28: 659-671.
- 76.** Castillo C, Hernandez J, Lopez-Alonso M, Miranda M, Benedito JL. Values of plasma lipid hydroperoxides and total antioxidant status in healthy dairy cows: preliminary observations. *Arch Anim Breed* 2003; 46: 227-233.
- 77.** Comborti M. Three models of free radical-induced cell injury. *Chem Biol Interact* 1989; 72 (1-2): 1-56.
- 78.** Devasena T, Lalitha S, Padma K. Lipid peroxidation, osmotic fragility and antioxidant status in children with acute post-streptococcal glomerulonephritis. *Clin Chim Acta* 2001; 308(1-2): 155-161.
- 79.** Grewal A, Ahuja CS, Singha SPS, Chaudhary KJ. Status of lipid peroxidation, some antioxidant enzymes and erythrocytic fragility of crossbred cattle naturally infected with *Theileria annulata*. *Vet Res Commun* 2005; 29: 387-394.
- 80.** May JM, Qu ZC, Mendiratta S. Protection and recycling of alpha tocopherol in human erythrocytes by intracellular ascorbic acid. *Arch Biochem Biophys* 1998; 349: 281-289.

- 81.** Reddy YN, Murthy SV, Krishna DR, Prabhakar MC. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. *Indian J Tub* 2004; 51: 213-218.
- 82.** Akiibinu MO, Ogunyemi EO, Shoyebo EO. Levels of oxidative metabolites, antioxidants and Neopterin in Nigerian pulmonary tuberculosis patients. *Europ J Gen Med* 2011; 8(3): 213-218.
- 83.** Madebo T, Lindtjorn B, Aukrust P, Berge RK. Circulating antioxidants and lipid peroxidation products in untreated tuberculosis patients in Ethiopia. *Am J Clin Nutr* 2003; 78: 117-122.
- 84.** Leung HW, Vang MJ, Mavis RD. The cooperative interaction between vitamin E and vitamin C in suppression of peroxidation of membrane phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 1981; 664: 266-272.
- 85.** Vannucchi H, Jordoa-Junior AA, Igllessias AC, Morandi MV, Chiarello PG. Effects of different dietary concentrations of vitamin E on lipid peroxidation in rats. *Arch Latinoam Nutr* 1997; 47: 34-37.
- 86.** Doba T, Burton GW, Ingold KU. Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C either alone or in the presence of vitamin E or a water soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipids liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1985; 835: 298-303.
- 87.** Barclay LRC, Locke SL, Macneil JM. The autoxidation of unsaturated lipids in micels. Synergism of inhibitors vitamin C and E. *Can J Chem* 1983; 61: 1288-1290.

- 88.** Niki E, Saito T, Kawakami A, Kamiya Y. Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C. *J Biol Chem* 1984; 259: 4177-4182.
- 89.** Eicher-Pruiett SD, Morrill JL, Blecha F, et al. Neutrophil and lymphocyte response to supplementation with vitamin C and E in young calves. *J Dairy Sci* 1992; 75: 1635-1642.
- 90.** Matsui T. Vitamin C nutrition in cattle. *Asian-Australas J Anim Sci* 2012; 25(5): 597–605.
- 91.** Kleczkowski M, Klucinski W, Shaktur A, Sikora J. Concentration of ascorbic acid in the blood of cows affected with mastitis. *Bull Vet Inst Pulawy* 2005; 49: 203-207.

8. ÖZGEÇMİŞ

26.07.1986 tarihinde Sivas ili Koyulhisar ilçesinde doğmuşum. İlk ve Orta eğitimimi burada tamamladıktan sonra lise öğrenimimi Sivas Selçuk Anadolu Lisesinde tamamladım. 2006 yılında F.Ü. Veteriner Fakültesini kazanarak, 2011 yılında bu fakülteden mezun oldum. 2012 yılında Erzincan ili İliç ilçesi Gıda Tarım ve Hayvancılık İlçe Müdürlüğünde Veteriner Hekim olarak göreve başladım. Erzincan ili İliç ve Refahiye ilçe müdürlüklerinde 4 yıl görev yaptıktan sonra Sivas İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğüne atandım ve halen aynı birimde görev yapmaktayım. Askerlik görevimi yaptım.