

758334

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE'DE YETİŞTİRİLEN BAZI SIĞIR IRKLARINDA
SIĞIR LÖKOSİT BAĞLANMA YETMEZLİĞİNİN (BLAD)
RESTRİKSİYON PARÇACIK UZUNLUK POLİMORFİZMİ
(RFLP) İLE BELİRLENMESİ**

Bilal AKYÜZ

**ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Okan ERTUĞRUL

**Bu Tez Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu tarafından VHAG-1918
proje numarası ve Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü tarafından
2002-7 proje numarası ile desteklenmiştir**

2004 - ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Zootekni Doktora Programı

çerçeveşinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir

Tez Savunma Tarihi: 16 / 07 /2004

Prof. Dr. Okan ERTUĞRUL
Ankara Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Ceyhan ÖZBEYAZ
Ankara Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Raportör

Prof. Dr. Serdar DİKER
Ankara Üniversitesi
Veteriner Fakültesi

Necmettin Ünal

Doç. Dr. Necmettin ÜNAL
Ankara Üniversitesi
Veteriner Fakültesi

Harun CERİT

Doç. Dr. Harun CERİT
İstanbul Üniversitesi
Veteriner Fakültesi

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-----------|
| Kabul ve Onay | ii |
| İçindekiler | iii |
| Önsöz | iv |
| Simgeler ve Kısaltmalar | v |
| Şekiller | vi |
| Cizelgeler | vii |
| | |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1. Nötrofil Graniülositler ve Görevleri | 4 |
| 1.2. Adezyon Molekülleri | 6 |
| 1.2.1. Integrinler. | 7 |
| 1.3. BLAD'a Neden Olan Mutasyon | 8 |
| 1.4. BLAD'ın Kalıtsal Bozukluk Olarak Tanımlanması | 10 |
| 1.5. Homozigot BLAD Vakalarında Görülen Klinik Belirtiler | 13 |
| 1.6. Hasta ve Taşıyıcıların Belirlenmesi | 16 |
| 1.6.1. Pedigri Analizi | 18 |
| 1.6.2. Test Birleştirmeleri | 20 |
| 1.6.3. Biyokimyasal Tanı | 21 |
| 1.6.4. Sitolojik Tanı | 22 |
| 1.6.5. Moleküler Tanı | 24 |
| 1.6.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Takiben Yapılan Restriksiyon Parçacık Büyüklük Polimorfizmi (RFLP) ile BLAD Allelinin Belirlenmesi | 27 |
| 1.6.5.2. Ligaz Zincir Reaksiyonu (LCR) | 28 |
| 1.6.6. Diğer Yöntemler | 30 |
| 1.7. BLAD'ın Yaygınlığı ve Yayılma Nedenleri | 32 |
| 2. GEREÇ VE YÖNTEM | 40 |
| 2.1. Hayvan Materyali | 40 |
| 2.2. Kan Alımı | 41 |
| 2.3. DNA İzolasyonu | 42 |
| 2.4. Kullanılan Primerler ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) | 43 |
| 2.5. Elektroforez | 45 |
| 2.5.1. Jel'in Hazırlanması | 46 |
| 2.5.2. Jel'in Dökülmesi | 47 |
| 2.5.3. Kuyulara Örneklerin yüklenmesi | 47 |
| 2.6. Bantların Gözlenmesi ve Fotoğraf Çekimi | 48 |
| 2.7. <i>Taq</i> I Restriksiyon Enzimi ile PCR Ürünlerinin Kesilmesi | 48 |
| 3. BULGULAR | 50 |
| 4. TARTIŞMA | 53 |
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER | 62 |
| ÖZET | 64 |
| SUMMARY | 65 |
| KAYNAKLAR | 66 |
| ÖZGEÇMIŞ | 74 |

ÖNSÖZ

Süt sığırı yetiştiriciliğinde Holştayn en yaygın kullanılan ırktır. Tüm dünyada yaygın olmasına rağmen bu ırkın damızlık boğaları, populasyonda mevcut hayvan sayısına göre azdır. Özellikle modern hayvan yetiştiriciliğinde suni tohumlama, embriyo transferi gibi gerek dişi hayvanlardan, gerekse erkek hayvanlardan elde edilecek yavru sayısını artırmıştır. Yine bu yöntemler damızlık boğa üreticilerine daha az ve daha elit boğaları elde tutma kolaylığı vermiştir. Öyle ki damızlık boğa ölse dahi, elde edilen ve saklanan spermaları ile genotipik özelliklerini yeni yavrulara aktarabilmektedir.

Bu modern yetişirme tekniklerinin avantajlarının yanında, genetik benzerliğin artmasına ve BLAD, DUMPS, Citrullinaemia gibi kalitsal kusurların hızla yayılmasına da neden olabilmektedir. Fakat modern hayvan yetiştiriciliğinde rutin olarak kullanılan moleküller genetik teknikler bu problemlerin ortadan kaldırılmasına imkan vermektedir.

Biz bu çalışmada, hayvan yetiştiriciliğinde kalitsal kusurların eradikasyon programlarında artık rutin olarak kullanılan moleküller genetik yöntemlerden biri olan PCR-RFLP'yi Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik ABD'de ki Moleküller Genetik laboratuvarında uygulamayı amaçladık. Ne mutlu ki çalışma sonunda hedefimize ulaşabildik.

Bu tezin planlanmasından, yazılmasına kadar geçen her aşamasında her başım sıkıştığında bana destek ve yardımcı olan tez danışmanım Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik A.B.D. öğretim üyesi Prof. Dr. Okan ERTUĞRUL'a, araştırma konusu ile ilgili bilgi ve materyal desteği veren Bernd KRIEGESMAN'a, tezi destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu ve Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsüne, araştırma materyali olan Holştayn boğa ve boğa adaylarından örnek almamı sağlayan ve araştırma sonucuna değer veren Damızlık Sığır Yetiştiricileri Merkez Birliği ve birlliğin Genel Sekreteri Fehmi AKSOY beye, birliğe bağlı illerle irtibatı kurarak örnek toplama aşamasını kolaylaştıran Vet. Hekim Çağla YÜKSEL KAYA hanıma, Ankara Üni. Vet. Fak. Eğitim Araştırma ve Uygulama Çiftliği Müdürlüğüne, Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne, Marmara Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne, Çukurova Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne, Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne, tezin daha iyi yazılması için yardımcılarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Orhan ALPAN, Prof. Dr. Ceyhan ÖZBEYAZ ve Prof. Dr. Serdar DİKER'e, tüm doktora eğitimim sırasında yardımcılarını esirgemeyen tüm Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Zootekni A.B.D. öğretim üyelerine, bu süre zarfında bana her konuda her zaman destek veren eşim Filiz AKYÜZ, oğlum Burak Yiğit AKYÜZ ve aileme teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|-------------------|--|
| BL | BLAD taşıyıcısı |
| BLAD | Sığır lökosit bağlanması yetmezliği (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency) |
| bp | Baz Çifti (Base Pairing) |
| °C | Sıcaklık |
| CLAD | Köpek lökosit bağlanması yetmezliği (Canine Leucocyte Adhesion Deficiency) |
| DAK | Doğu Anadolu Kırmızısı |
| D128G | Mutant CD18 geni |
| dk | Dakika |
| DNA | Deoksiribo Nükleik Asit |
| dNTP | Deoksinükleotid Trifosfat |
| dATP | Deoksiadenin Trifosfat |
| dCTP | Deoksisitozin Trifosfat |
| dGTP | Deoksiguanin Trifosfat |
| dTTP | Deoksitimin Trifosfat |
| DSYMB | Damızlık Sığır Yetiştiriciler Merkez Birliği |
| DUMPS | Üridin Monofosfat Senteaz Yetmezliği (Deficiency of Uridine Monophosphate Senteaz,) |
| g | Gram |
| GAK | Güney Anadolu Kırmızısı |
| ICAM-1 | Inter sellüler adezyon molekülü-1 (CD54) |
| kDA | Kilo Dalton |
| kg | Kilogram |
| LAD | Lökosit bağlanması yetmezliği (Leukocyte Adhesion Deficiency) |
| LCR | Ligaz Zincir Reaksiyonu (Ligase Chain Reaction) |
| LFA-1 | Lökosit fonksiyon antijen-1 (CD11a), |
| Mac-1 | Membran yapışma parçası-1 (CD11b) |
| MgCl ₂ | Magnezyum Klorür |
| ml | Mili Litre |
| mM | Mili Molar |
| µl | Mikro Litre |
| ng | Nano Gram |
| PCR | Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction) |
| RFLP | Restriksiyon Parçacık Büyüklük Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism) |
| SDS | Sodyum Dodesil Sulfat |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| TE | Tris-EDTA |
| TL | BLAD taşımayan |
| TNE | Tris-NaCl-EDTA |
| U | Ünite |
| UV | Ultra-Viyole |
| WHO | Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation) |

ŞEKİLLER

Sayfa No

| | |
|--|----|
| Şekil 1: Fenol-Kloroform yöntemi ile elde edilen örneklerde ait genomik DNA'ların % 1'lük agaroz jeldeki görünümleri. Laboratuarda verilen örnek numaralarına göre jele yüklenen örnekler, soldan-sağ: Güney Anadolu Kırmızısı 11, Boz Irk 18, İsviçre Esmeri 1, Yerli Kara 5, Doğu Anadolu Kırmızısı 805, Lalahan 1, Menemen 14, Beydere 5, Lalahan ♀. | 50 |
| Şekil 2: Fenol-Kloroform yöntemi ile elde edilen örneklerde ait DNA'lar kullanılarak yapılan PCR sonunda elde edilen ürünlerin % 2'lük agaroz jel elektroforez görünümleri. Soldan-sağ jele yüklenen örnekler, 100 bp'lik DNA Merdiveni, Güney Anadolu Kırmızısı 11, Boz Irk 18, İsviçre Esmeri 1, Yerli Kara 5, Doğu Anadolu Kırmızısı 805, Lalahan 1, Menemen 14, Beydere 5, Lalahan ♀. | 51 |
| Şekil 3; <i>Taq I</i> Endonükleaz enzimi ile kesilen PCR ürünlerinin % 2'lük agaroz jel elektroforezi sonucu BLAD açısından genetik yapılarının belirlenmesi: Soldan, sağa örneklerin sıralanması, 100 bp'lik DNA Merdiveni, Doğu Anadolu Kırmızısı 805, İsviçre Esmeri 6, Menemen 12 (BLAD +/-), Menemen 14, Beydere 5, BLAD +/- (kontrol), BLAD +/+ (kontrol), BLAD -/- (kontrol), | 52 |

ÇİZELGELER

Sayfa No

Çizelge 1: Çalışmada kullanılanırklar, kullanılan örneklerin
sayısı ve örneklerin alındığı yerler.

41



1. GİRİŞ

Sığır lökosit bağlanması yetmezliği (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency, BLAD) letal, otozomal, resesif, kalıtsal bir bozukluktur (Kehrli ve ark., 1992a; Batt, 1994; Kaneko ve ark., 1997; Jánosa ve ark., 1999; Spes ve ark., 1999). Lökosit bağlanması yetmezliği (LAD), β_2 integrin yokluğu, CD18 yokluğu, CD11/CD18 yokluğu, Mac-1 yokluğu, Hagemoser-Takahasi Sendromu, Granülositopati Sendromu olarak da adlandırılan BLAD, sığır karyotipinin 1 numaralı kromozomundaki CD18 glikoproteinini kodlayan gende meydana gelen bir nokta mutasyonu sonucu ortaya çıkar. BLAD, incelenen sığır ırkları arasında sadece Holştayn sığır ırkında görülmüştür (Müller ve ark., 1997; Millar ve ark., 2000; Anonim6, 2001).

Bu kalıtsal bozukluk, Holştayn ırkı sığırlar dışında insanlarda ve İrlanda Seter köpek ırkında da görülmektedir. Bozukluk, insanlarda; lökosit bağlanması yetmezliği (Leucocyte Adhesion Deficiency, LAD), köpeklerde; köpek lökosit bağlanması yetmezliği (Canine Leucocyte Adhesion Deficiency, CLAD) olarak adlandırılır. Bu üç türde de kalıtsal bozukluk CD18 glikoproteinini kodlayan gende meydana gelen nokta mutasyonu sonucu oluşur (Gerardi, 1996; Müller ve ark., 1997; Sampson ve ark., 2000). BLAD vakalarındaki klinik görünüm ve histopatolojik bulgular, insanlarda ve İrlanda Seter ırkı köpeklerde daha önce bildirilmiş olan CD11/CD18 glikoprotein kompleksinin hatalı oluşması sonucu meydana gelen kalıtsal bozukluklara çok benzer. Her üç türde de прогноз hemen hemen aynıdır (Kehrli ve ark., 1990). Ancak, CLAD ve LAD vakalarının karakteristik semptomları olan göbek ve eklem yanıkları BLAD'da görülmez (Jánosa ve ark., 1999).

Lökosit integrinlerinin tamamen veya kısmen yokluğu sonucu yeni doğan bebeklerde ortaya çıkan ender görülen otozomal, resesif kalıtsal bir bozukluk olan LAD ilk olarak 1974 yılında A.B.D. de tanımlanmıştır (Kehrli ve ark., 1992a; Back ve ark., 1993; Jeyaseelan ve ark., 2000; Roos ve Law, 2001). İnsanlarda bu kalıtsal bozukluğun kesin insidensi bilinmemektedir (Kostetskii ve ark., 1996). LAD, lökosit

hücre zarında bulunan ve lökositlerin damar endotel hücrelerine bağlanmalarını sağlayan β_2 integrinlerin β alt ünitesini oluşturan CD18 glikoproteinini kodlayan gende meydana gelen nokta mutasyonunun sonucu oluşur (Springer, 1990; Mathew ve ark., 2000). Meydana gelen bu mutasyon lökositlerin özellikle de nötrofil lökositlerin, damar duvarına yapışarak enfeksiyon bölgelerine ulaşmalarına engel olur (Kehrli ve ark., 1992b; Back ve ark., 1993; Roos ve Law, 2001).

Bu mutasyonun homozigot olarak bulunduğu LAD vakalarında, Dünya Sağlık Örgütünün (WHO) CD11/CD18 olarak adlandırdığı Mac-1, LFA-1 ve p150,95 glikoproteinlerinin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin ya tamamı ya da tamamına yakını yoktur (Mathew ve ark., 2000). β alt ünitesini (CD18) kodlayan gende meydana gelen mutasyonlar LAD vakalarının hepsinde hastalığın temel nedeni olarak belirlenmiştir (Kehrli ve ark., 1990).

LAD, yeni doğan bebeklerde immun sistemin baskılanmasına neden olmaktadır. Bu da homozigot bebeklerde tekrarlayan bakteriyel ve fungal enfeksiyonların görülmesine neden olur. Homozigot bebeklerde tekrarlayan yumuşak doku enfeksiyonları, yara iyileşmesinde gecikme, göbek kordonunun geç düşmesi ve özellikle de nötrofil lökosit artışı ile karakterize olan devamlı ilerleyici lökosit artışı görülür (Roos ve Law, 2001). Bu semptomların bildirildiği bebeklerde, nötrofillerin fagositoz yapabilmeleri için gerekli olan, damar endotelyumunu geçerek damar dışına doğru hareket etme yeteneklerinin olmadığı belirlenmiştir (Kehrli ve ark., 1990; Müller ve ark., 1997; Mathew ve ark., 2000). Bu bebeklerin nötrofilleri damar endotelyumunu geçemedikleri için kemotaktik maddelere yanıt veremez ve enfeksiyon bölgесine ulaşamazlar (Springer, 1990; Back ve ark., 1993).

Bir çok LAD hastası yoğun antibiyotik tedavisine rağmen erken yaşta ölürl. Kemik iliği nakli LAD'ın tek tedavi şeklidir (Springer, 1990; Roos ve Law, 2001).

A.B.D. de Renshaw ve arkadaşları, 1975 yılında daha önce insanlarda bildirilen LAD'a benzer semptomların İrlanda Seter köpeklerinde de görüldüğünü

belirlemişlerdir (Gerardi, 1996; Kijias ve ark., 1999; Sampson ve ark., 2000). Sadece İrlanda Seter köpek ırkında görülen bu hastalık, köpek lökosit bağlanması yetmezliği (CLAD) olarak adlandırılmıştır (Gerardi, 1996).

Giger ve arkadaşları 1987 yılında, tekrarlayan enfeksiyonlardan şikayetçi granülositopati sendromlu bir İrlanda Seter köpeğinde CD11/CD18 glikoproteininin olmadığını belirlemişlerdir (Kijias ve ark., 1999). Daha sonra CLAD vakalarında, köpek lökosit hücre zarında bulunan CD18 glikoproteinini kodlayan genin 107. pozisyonunda bulunan “Guanin” bazının “Sitozin” bazı ile yer değiştmesine neden olan bir nokta mutasyonun olduğu belirlenmiştir. Meydana gelen bu mutasyon sonucunda CD18 geninin kodladığı glikoproteinin 36. amino asit olan “Sistein” amino asidinin “Serin” amino asidi ile yer değiştirdiği belirlenmiştir (Kijias ve ark., 2000).

Takaishi ve arkadaşları, ilk olarak 1980’li yılların başında bazı Holştain buzağılarında, insanlardaki LAD ve köpeklerdeki CLAD’a benzer klinik tablo ile seyreden bir hastalık belirlemişler ve hastalığı sığır granülositopati sendromu olarak adlandırmışlardır (Tajima, 1993; Mirck ve ark., 1995; Gerardi, 1996; Kehrli ve ark., 2000; Sampson ve ark., 2000). Amerikalı araştırmacı Marchus Kehrli ve arkadaşları 1992 yılında, sığır granülositopati sendromu hastalığının nedenini belirlemişlerdir. Bu araştırmacılar, hastalığın nedeninin sığır lökosit hücre zarında bulunan ve lökosit bağlanması glikoproteinlerini kodlayan gende meydana gelen bir nokta mutasyonunu olduğunu belirlemişlerdir. Bu mutasyonun neden olduğu kalitsal bozukluğu da BLAD olarak adlandırmışlardır (Mirck ve ark., 1995; Tammen ve ark., 1996). BLAD kalitsal bozukluğu yönünden homozigot olan buzağıların lökosit hücre zarlarında β_2 integrinlerin ya hiç olmadığı ya da miktarlarının önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir (Anonim3, 2000; Jeyaseelan ve ark., 2000).

1.1. Nötrofil Granülositler ve Görevleri

Yüksek yapılı canlılarda vücutun savunma elemanları olan lökositler, granüllü ve granülsüz lökositler olarak iki gruba ayrırlar. Hem granüllü hem de granülsüz lökositler vücutta yabancı bir mikroorganizma veya toksin girdiğinde aldıkları uyarılarla damar endotel hücrelerini geçerek bu yabancı madde ve mikroorganizmaların bulunduğu yere doğru hareket ederler. Nötrofiller, bakteriyel enfeksiyonlara karşı organizmanın savunmasında çok önemlidirler. Yabancı mikroorganizmaların vücutta girdiği bölgeye ilk ulaşan lökositler nötrofil lökositlerdir. Nötrofiller, vücutta giren yabancı partiküllere, özellikle mikroorganizmalara ilk müdahaleyi yapan fagositik hücrelerdir. Nötrofiller, vücutta bir enfeksiyon etkeni girerek yangı oluşturduğunda derhal damar duvarını geçerek, yangı bölgesine ulaşırlar. Burada fagositoz yoluyla mikrobiyel proteinleri sitoplazmaları içine alarak sahip oldukları granüllerin içindeki sindirim enzimleriyle sindirirler (Gerardi, 1996; Sağlam ve ark., 1997; Jánosa ve ark., 1999; Nagahata ve ark., 2000).

Lökositlerin damar dışına çıkması, bakterilerin dokuları istilasına karşı vücutun savunmasında ve yaralanmış dokunun tamirinde hayatı bir rol oynar. Akut yangı bölgesindeki dokular tarafından salgılanan lipidler ve peptidler nötrofilleri yangı bölgesine çekerler. Ayrıca bakteriyel kaynaklı kemotaksise neden olan ajanlar da, nötrofillerin yangı bölgesine doğru göç etmesine neden olur. Bu uyarıcılar hem lökositleri hem de endotel hücrelerini aktive ederler. Lökositlerin damar dışına çıkabilmeleri bu aktivasyon sayesinde, lökosit ve endotel hücrelerinin hücre yüzeylerinde bulunan adezyon molekülleri birleşmeleri ile olur (Harlan, 2001; Lee ve Kehrli, 2003). Bu özel bağlanma sonucunda kan dolaşımındaki lökositler, kılcal damar duvarlarını kaplayan endotel hücrelerine tutunurlar. Böylelikle lökositler endotel hücreleri arasından yalancı ayaklarını çıkararak yangılı dokuya doğru hareket ederler (Harlan, 2001).

Nötrofillerin yaptığı fagositoz olayı; kemotaksis, bağlanma, yutma ve sindirme olarak dört aşamaya ayrılabilir. Kemotaksis, nötrofillerin kendilerini çeken maddelere doğru hareket etmeleridir. Mikroorganizmaların dokuları istilası ve buna bağlı olarak meydana gelen doku yıkımı sonucu dokuda lokal olarak birçok kemotaktik madde açığa çıkar. Normal koşullarda kan damarları içinde bulunan nötrofiller bakteri istilası veya doku tahribatı durumunda, hasarlı dokudan geçen kılcal damarlarda ilerlerken, açığa çıkan kemotaktik maddeleri algılarlar. Kemotaktik maddeler, bir taraftan nötrofilleri dokuya çekerken diğer taraftan yanılı dokudaki damar endotel hücrelerinin nötrofillere yapışma özelliklerini arttırlar (Sağlam ve ark., 1997; Diker, 1998).

Lökositlerin vücuda giren yabancı mikroorganizmalarla savaşabilmeleri için hücre zarlarında bulunan bağlanma glikoproteinleri yardımıyla kan damarlarının iç yüzeyini kaplayan endotel hücrelerine bağlanması gereklidir. Bu sayede lökositler damar dışına çıkarak enfeksiyonun olduğu bölgeye doğru hareket edebilirler (Anonim2, 2000; Anonim4, 2000; Kehrli, 2000). Nötrofiller ve damar endotel hücreleri arasındaki bağlanmada asıl rolü, lökosit adezyon moleküllerinden β_2 integrinler (CD1abc/CD18) ve damar endotel hücrelerinde bulunan L-Selektin hücre yüzey reseptörleri üstlenirler (Nagahata ve ark., 2000).

L-Selektinler, yanılı dokularda damar endotel hücreleri ile nötrofiller arasında ilk kontağın kurulmasını sağlar ve nötrofillerin organizmda görevlerini yerine getirmesine aracılık ederler (Nagahata ve ark., 2000). Hem nötrofil hücre zarında bulunan integrin ailesi proteinlerinden β_2 integrinler hem de damar endotel hücrelerinin hücre zarlarında bulunan L-Selektin sayesinde lökositler kemotaksis ve fagositozis görevlerini yerine getirebilirler (Tajima ve ark., 1993; Kehrli, 2000; Spes ve ark., 2000).

Bu bağlanma glikoproteinlerinde meydana gelecek herhangi bir bozukluk lökositlerin damar endotel hücrelerine bağlanmalarını engeller. Bunun sonucunda lökositler damar endotel duvarını aşamazlar ve enfeksiyon bölgesinin etrafındaki kan

damarlarında çok miktarda lökosit olsa bile, bu lökositler damar dışına çıkamazlar. Dolayısıyla dokuya yerleşmiş olan enfeksiyon etkenleriyle savaşamazlar. Yani bu glikoproteinler olmaksızın nötrofil lökositler görevlerini yapamazlar (Kaneko ve ark., 1997).

1.2. Adezyon Molekülleri

Vücuttaki tüm hücrelerin birbirlerine veya ekstrasellüler matrikse yapışmaları ve birbirleriyle temasları, hücre zarında bulunan protein yapısında olan hücre adezyon molekülleri tarafından kontrol edilir (Tajima ve ark., 1993; Diker, 1998).

Bu moleküller, integrinler, kaderinler, immunglobulinler ve selektinler olmak üzere dört aileye ayrırlılar (Tajima ve ark., 1993; Diker, 1998).

Ancak bu dört aileye ek olarak CD36 ailesi, reseptör protein tirozin fosfataz ailesi, hyaluronat ailesi, hücre yüzey proteoglikan ailesi, sialomusin ailesi ve CD44 süper ailesinin de var olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından bildirmiştir (Freemont ve Hoyland, 1996; McGregor ve ark., 1998; Pir, 2001)

Bu adezyon moleküllerinden integrinler, hücre-hücre ve hücre-matriks bağlanmasında görevli hücre zarı reseptörleridir (Gilbert ve ark., 1993; Freemont ve Hoyland, 1996; Roos ve Law, 2001). Ayrıca embriyogenetik, tümör oluşumu ve metastaz, apopitoz, hemostaz, kemik rezorpsiyonu, yara iyileşmesi, immun yanıt ve malignant hücrelerin hareketlerinde de integrinler görev yaparlar (Gilbert ve ark., 1993; McGregor ve ark., 1998). Integrin ailesi adezyon molekülleri kan pulcukları, lökositler, hemopoietik kök hücreleri, endotelyal hücreler ve bazı tümör hücrelerinin hücre zarlarında bulunur (Cox ve ark., 1997).

1.2.1. Integrinler

Tüm integrinler alfa (120 kDa) ve beta (83 kDa) zincirinden oluşmuş heterodimer glikoproteinlerdir (Cox ve ark., 1997; Diker, 1998).

Integrin ailesi içinde bulunan β_2 integrinler sadece lökosit hücre zarında bulunmaları nedeniyle löko-integrinler olarak da adlandırılırlar (Springer, 1990; Elangbam ve ark., 1997; Jeyaseelan ve ark., 2000). β_2 Integrinler lökositlerin damar endotel hücrelerine bağlanmalarını sağlayan reseptörlerdir (Jeyaseelan ve ark., 2000; Roos ve Law, 2001). β_2 integrinlerin görevi, mikrobiyel ajanların neden olduğu enfeksiyonlara karşı canlinın savunma elemanları olan lökositlerin görevlerini yapabilmeleri için damar endotel hücrelerine bağlanmalarını sağlamaktır (Back ve ark., 1993; Kostetskii ve ark., 1996; Cox ve ark., 1997). β_2 integrinler, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından CD11/CD18 olarak adlandırılır β ve α alt ünitelerinden oluşurlar (Kehrli ve ark., 1990; Back ve ark., 1993; Gilbert ve ark., 1993). β (CD18) alt ünitesi, tek bir üniteden oluşurken α (CD11) alt ünitesi, lökosit fonksiyon antijen-1 (LFA-1, CD11a), membran yapışma parçası-1 (Mac-1, CD11b) ve p150,95 (CD11c) olarak adlandırılan ünitelerden oluşmuştur (Kehrli ve ark., 1992c; Rutten ve ark., 1996; Cox ve ark., 1997; Kehrli, 2000).

β_2 integrinlerin β alt ünitesi CD18'in miktarı, yeni doğan buzağılarda bir aylık buzağılardakinden daha çoktur. Doğumdan bir gün sonra CD18 miktarında önemli bir düşme görülür. CD18 seviyesi, ancak doğumdan iki gün sonra tekrar artmaya başlar. Fakat CD18 seviyesi hiçbir zaman tekrar yeni doğandaki seviyesine ulaşamaz (Lee ve Kehrli, 2003).

Nötrofillerin damar içinden yangının olduğu dokuya doğru göçü, damar endotel hücre zarında bulunan intersellüler adezyon molekülleri ile nötrofil hücre zarında bulunan Mac-1 ve LFA-1'lerin özel olarak bağlanmaları ile olur (Kehrli ve ark., 1992a; Gilbert ve ark., 1993).

Lökositlerin üzerindeki LFA-1 (CD11a/CD18) ve Mac-1 (CD11b/CD18) kapillar endotel hücrelerinin hücre zarlarında bulunan ICAM-1,-2,-3 arasında bir ilişki vardır. Lökositlerin, yangı bölgelerindeki yoğun endotelli vena duvarlarına bağlanarak, kan dolaşımından doku içine ve bronko alveoler boşluğuna geçmelerini bu ilişki sağlar (Cox ve ark., 1997; Huan ve Springer, 1997; Soethout ve ark., 2002).

Bu ilişki sayesinde kan dolaşımındaki lökositler kılcal damar endotel hücrelerine bağlanarak yangı bölgelerine ulaşırlar. Bu olayda endotel hücre zarında bulunan inter sellüler adezyon molekülü-1 (CD54: ICAM-1) ve lökosit hücre zarında bulunan β_2 integrinleri [LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18)] sayesinde gerçekleşir. Yani β_2 integrinler ve ICAM-1 arasındaki kurulan bağ sayesinde nötrofiller damar dışına çıkabilirler (Radi ve ark., 1999; Lee ve Kehrli, 2003). Burada, Mac-1 aktive olmuş endotel hücresinde lökositlerin bağlanmalarına aracılık ederken, LFA-1 ise damar endotel hücrelerinin hücre yüzeylerinde bulunan ve karşıtı olan iki reseptör, ICAM-1 ve ICAM-2 ile birleşir (Kehrli ve ark., 1992c; Diker, 1998).

Bu birleşmenin olması için nötrofil hücre zarında yeterli miktarda β_2 integrinlerinin olması gereklidir. Bunun içinde β_2 integrinleri oluşturan α ve β alt ünitelerinin birleşmesi gerekir. Eğer α ve β alt ünitelerinin birbirlerine bağlanması bir şekilde engellenirse β_2 integrinler oluşamaz ve nötrofiller endotel hücrelerine bağlanarak enfeksiyon bölgeye doğru hareket edemezler (Jánosa ve ark., 1999; Lee ve Kehrli, 2003). Sonuçta da canlinin hastalıklara karşı duyarlılığı artar (Lee ve Kehrli, 2003).

1.3. BLAD'a Neden Olan Mutasyon

β_2 integrinler, nötrofillerin endotel hücrelerine bağlanmalarında en önemli reseptörlerdir. Nötrofillerde bu reseptörlerin yokluğu, canlıda görülen enfeksiyon sırasında canlinin periferal kan dolaşımındaki nötrofil sayısında artışa neden olurken doku içindeki nötrofil miktarında ise azalmaya neden olur (Spes ve ark., 2001).

Holştayn sığır ırkında görülen BLAD, β_2 -integrin ailesinin ortak β alt ünitesi CD18'i kodlayan gende meydana gelen bir nokta mutasyonunun neden olduğu resesif kalıtım yolu izleyen genetik bir bozukluktur. β_2 integrin moleküllerinin görev yapabilmeleri için öncelikle CD11/CD18 bimoleküler kompleksin oluşması gerekmektedir. BLAD'lı lökositlerin, hücre zarlarında CD11/CD18 kompleksi ya hiç yoktur ya da çok azalmıştır (Kehrli ve ark., 1992b; Rutten ve ark., 1996; Jánosa ve ark., 1999; Kijias ve ark., 2000).

Heterodimer β_2 integrin adezyon glikoproteininin β alt ünitesini (CD18) kodlayan genin 383. nükleotidinde bulunan bir "Guanin" bazı, meydana gelen bir nokta mutasyonu sonucunda "Adenin" bazı ile yer değiştirir. Tek bir baz değişimine neden olan bu mutasyon sonucunda CD18 glikoproteinini oluşturan amino asit diziliminin 128. amino asit olan "Aspartik Asit" "Glisin" ile yer değiştirir (Kehrli ve ark., 1992a; Mirck ve ark., 1995; Cox ve ark., 1997; Kehrli, 2000). CD18 glikoprotein geninin kodladığı glikoproteinin 128. amino asitinde de bir değişme olduğu için mutasyona D128G mutasyonu da denmektedir (Ryncarz ve ark., 1995; Cox ve ark., 1997).

CD18 glikoproteinini kodlayan gende meydana gelen D128G mutasyonu, sığır lökositlerinin hücre zarında bulunan löko-integrinlerin CD18 ve CD11 alt üniteleri arasındaki kompleksin oluşumunu engeller. Lökositlerin damar dışına çıkmaları için gerekli olan CD11/CD18 adezyon glikoprotein kompleksinin oluşamaması nedeniyle de lökositlerin damar dışına çıkması büyük ölçüde engellenir (Steinholt ve ark., 1994; Cox ve ark., 1997; Kehrli, 2000). Bu mutasyon yönünden heterozigot sığırların nötrofillerindeki CD18 glikoprotein miktarında bir azalma olabilir. Ancak heterozigot hayvanlarda bu azalma kesin olarak saptanamamıştır. Mutant alleli homozigot olarak bulunduran hayvanlarda CD18 glikoprotein miktarı ve dolayısıyla da β_2 integrin miktarı ya çok azalmış ya da hiç yoktur (Shuster ve ark., 1992; Mirck ve ark., 1995; Cox ve ark., 1997).

BLAD yönünden homozigot olarak belirlenen bazı buzağılarda, CD18'i kodlayan genin 775. nükleotidinde bir "Timin-Sitozin" yer değiştirmesine neden olan başka bir

nokta mutasyonu daha belirlenmiştir. Fakat, bu nokta mutasyonunun CD18 glikoproteininin amino asit dizininde bir değişikliğe neden olmadığı, dolayısıyla da herhangi bir klinik bozukluğa sebep olmayan “silence mutasyon” olduğu belirlenmiştir. Bu ikinci mutasyona homozigot olarak sahip buzağıların her iki ebeveyni incelendiğinde aynı nokta mutasyonu bakımından da heterozigot oldukları belirlenmiştir (Kehrli ve ark., 1992a; Tajima ve ark., 1993; Kaneko ve ark., 1997; Kehrli, 2000).

1.4. BLAD’ın Kalıtsal Bozukluk Olarak Tanımlanması

BLAD genine homozigot olarak sahip hayvanlarda genel enfeksiyonlar görüldüğü için BLAD daha önce ayrı bir hastalık olarak tanımlanamamıştır (Gilbert ve ark., 1993). İlk olarak 1983 yılında A.B.D. de BLAD’ın neden olduğu klinik belirtilerin görüldüğü Holştayn buzağılar belirlenmiştir. Buzaılarda klinik belirtilerin ortaya çıkmasına neden olan bozukluk “granülositopati sendromu” olarak tanımlanmışlardır. Granülositopati sendromu gösteren Holştayn buzağılar iki yıl boyunca kontrol edildiğinde, buzağılarında enfeksiyon ajanlarına karşı artan oranda duyarlılık ve devamlı nötrofili ile karakterize olan bir hastalık kompleksini belirlenmiştir (Gilbert ve ark., 1993; Mirck ve ark., 1995).

BLAD’lı hayvanların kan damarlarında bir nötrofil artışı olmasına rağmen periferal yangılara karşı her hangi bir nötrofil yanıtı görülmemiştir. Benzer bir hastalık daha sonra Japonya’dada bildirilmiştir. Japonya’dada bazı Holştayn buzağılarında kronik ve tekrarlayan akciğer ve sindirim sistemi enfeksiyonlarının görüldüğünü bildirmiştir. Ayrıca bu enfeksiyonların görüldüğü buzaılarda nötrofil artışı da belirlemiştir. Kronik ve tekrarlayan akciğer ve sindirim sistemi enfeksiyonları ve devamlı nötrofil artışı gösteren buzağıların pedigri bilgileri de incelenmiştir. Pedigri bilgilerine dayanarak Holştayn buzağılarında rastlanan bu klinik tabloya otozomal resesif kalıtım yolu izleyen kalıtsal bir bozukluğun sebep olduğu bildirilmiştir (Gilbert ve ark., 1993).

İlk olarak Japonya'da Takaishi ve arkadaşları tarafından bildirilen kalıtsal bozukluk, sığır lökosit bağlanması yetmezliği (BLAD) olarak ilk kez 1989 yılında A.B.D. de Veteriner Hekim Dr. Mark Kehrli tarafından isimlendirilmiştir (Özbeyaz, 1997). Kehrli ve Dale Shuster, 1990 yılında bu bozukluğun lökositlerin enfekte dokuya geçmeleri için gerekli olan β_2 integrinlerinin β alt ünitesi olan CD18'in tamamen veya büyük oranda olmaması sonucu olduğunu belirlemiştir (Gilbert ve ark., 1993; Mirck ve ark., 1995; Anonim6, 2001). CD18'in yokluğunun da Mac-1 (CD11b/CD18) glikoproteininin kompleksinin oluşmasını engellemesi sonucunda nötrofil fonksiyonlarının bozulmasına neden olduğunu belirlemiştir (Gilbert ve ark., 1993; Rutten ve ark., 1996).

Amerikalı araştırmacılar Mark Kehri ve Dale Shuster 1990 yılında, Holstayn sığırları içinden sağlıklı görülen bir anne ve bunun yeni doğan buzağısını rasgele seçerek kontrol grubuna ayırmışlardır. Bu buzağıdan doğum sonrasında hemen kan alınarak lökosit sayımı yapılmıştır. İlk sayımdayken, kandaki toplam lökosit sayısı 14.000 adet/ μl olarak sayılmıştır. Doğumu takip eden ikinci günden tekrar kan alınıp kan hücresi sayımı yapıldığında lökosit sayısı 17.000 adet/ μl ve doğumdan 7 gün sonra ise 34.600 adet/ μl olarak sayılmıştır. Tekrar 41. günden kan sayımı yapıldığında tüm lökositlerin %85'inden fazlası nötrofil lökosit olan 100.000 adet/ $\mu\text{l}'yi$ aşan lökosit sayılmıştır. Buzağı ve annesinden elde edilen lökositler incelendiğinde anne ve yavrunun lökositlerinde hiç bir fonksiyonel anormallik bulunamamıştır ve buzağı doğum takip eden 48. günden ölmüştür. Buzağının klinik ve patolojik bulguları incelenmiştir. Sonuçta daha önce insanlarda ve İrlanda Seter köpeklerinde görülen CD11/CD18 lökosit bağlama glikoprotein kompleksinin kalıtsal olarak eksikliği sonucu ortaya çıkan lökosit bağlama noksantılığı, LAD ve CLAD'a benzer bir bozukluğun var olduğu belirlenmiştir. Buzağıdan elde edilen nötrofillerin immünolojik analizi yapıldığında nötrofil lökosit hücrelerinde CD11/CD18 bağlama glikoproteinlerinin olmadığı saptanmıştır. Daha sonra bu buzağının fenotipik olarak normal görünüşlü olan annesi, babası ve 15 baba bir kardeşi incelenmiştir. Bu inceleme sonucunda buzağının annesi, babası ve 15 baba bir kardeşinin 8'inde CD11/CD18 bağlama glikoproteinlerinin miktarında önemli bir azalma olduğu

belirlenmiştir (Kehrli ve ark., 1992a). Kehri ve Shuster, homozigot BLAD vakalarının pedigrilerini inceleyerek A.B.D. de suni tohumlamada yaygın olarak kullanılan tanınmış bir Holştayn boğasının, hastalığın potansiyel taşıyıcısı olduğunu belirlemiştirlerdir (Gilbert ve ark., 1993).

Shuster ve arkadaşları 1992 yılında normal sığır CD18 geni ve BLAD'a neden olan mutant CD18 genini belirlemiştirlerdir. DNA kullanılarak yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) ile homozigot BLAD'lı, heterozigot taşıyıcı ve homozigot normal bireyleri belirlemiştir (Gilbert ve ark., 1993; Mirck ve ark., 1995). Aynı araştırmacılar, granülositopati sendromlu bir Holştayn buzağıdan elde ettikleri lökositlerin immunolojik analizinde, lökosit hücre zarında bulunması gereken CD18 bağlanması glikoprotein miktarının düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Daha sonra hasta buzağının lökositlerinden elde edilen CD18 glikoproteinlerinden, CD18 glikoproteinini sentezleyen DNA'nın tamamlayıcı DNA'sını (cDNA) sentezlemiştirlerdir. Daha sonra normal ve granülositopati sendromu gösteren Holştayn buzaqlardan aynı bölgelerin cDNA'sı üretilmiştir. Elde edilen bu iki cDNA'nın incelenmesi sonucunda normal ve hasta bireylerin cDNA'ları arasında büyüklik farklılığı olmadığı belirlenmiştir. BLAD kalıtsal bozukluğuna sebep olan mutasyonun, büyük bir delesyon ya da transkripsiyon defekti olmadığı anlaşılmıştır. Sığır CD18 genine ait cDNA'lar polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldıktan sonra tek iplikçik haline getirilerek direkt dizin analizi yapılmıştır. Sonuçta, CD18'i kodlayan genin 383. nükleotidinde bir nokta mutasyonu olduğu, bununda bir "Guanin" organik bazının bir "Adenin" organik bazıyla yer değiştirmesine neden olduğu saptanmıştır. Meydana gelen organik baz değişikliği de CD18 glikoproteinini oluşturan amino asit sırasındaki 128. amino asit olan "Aspartik Asit" amino asitinin "Glisin" amino asidi ile yer değiştirmesine neden olmuştur. Mutant allele D128G, normal allele ise CD18 olarak adlandırılmıştır (Shuster ve ark., 1992; Agerholm ve ark., 1993; Kijias ve ark., 2000).

1.5. Homozigot BLAD Vakalarında Görülen Klinik Belirtiler

Lökositlerin bağlanma yetmezliği insanlar, köpekler ve sığirlarda benzer klinik belirtiler gösterir. Nitekim, yeni doğan BLAD'lı buzağılardaki klinik belirtiler, LAD'lı bebeklerde görülen klinik belirtilere çok benzettiği için BLAD'ın moleküler temeli belirlenebilmiştir.

BLAD'ta, homozigot hayvanların klinik olarak belirlenmesini sağlayan özel klinik belirtiler yoktur. Ancak homozigot hayvanlarda lökosit hücre zarlarında bulunan bağlanma proteinlerinin tamamen yokluğu veya önemli ölçüde azalması lökositlerin damar duvarını geçerek enfeksiyon etkenleriyle savaşmalarını engeller. Bu nedenle BLAD'lı buzağılarda tekrarlayan solunum ve sindirim sistemi enfeksiyonlarına sıkılıkla rastlanır (Kehrli ve ark., 1990; Agerholm ve ark., 1993; Ackermann ve ark., 1996; Arrayet ve ark., 2002).

BLAD vakalarında görülen semptomlar oldukça farklıdır (Jánosa ve ark., 1999). Genellikle bu belirtiler homozigot buzağılarda doğumdan hemen sonra görülür. Ancak bu belirtilerin hiçbirinin erken dönemde görülmediği BLAD vakaları da vardır (Agerholm ve ark., 1993).

BLAD'a neden olan nokta mutasyonu, organizmanın hücresel savunma elemanları olan lökositlerin damar dışına çıkmalarını engellediği için lökositlerin organizmayı savunma görevlerini aksatır. Bunun sonucu olarak BLAD'lı buzağıların sindirim ve solunum sistemlerinde sık ve tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlar görülür (Ackerman ve ark., 1999; Anonim4, 2000; Anonim5, 2000). Homozigot hayvanlarda, lökositlerin kan dolaşımından enfekte dokulara geçememeleri enfeksiyonlara karşı aşırı duyarlılığa neden olur. Sonuçta hasta hayvanlar erken yaşta ölürlər (Kehrli ve ark., 1990; Anonim6, 2000). Bu kalitsal bozukluğa homozigot olarak sahip olan buzağılar sürüde bulunan genel enfeksiyonlara kolay yakalanırlar ve nonpatojenik mikroorganizmalar tarafından da kolay etkilenirler. Homozigot

buzağılar eğer yaşamlarının ilk yılında ölmezlerse, bu buzağılarda ileri derecede büyümeye geriliği ve bitmeyen enfeksiyonlar görülecektir(Jánosa ve ark., 1999).

Hasta buzağıların sindirim sistemlerinde, ağız mukozasında geniş ve yaygın ülser alanları vardır. Diş etlerinde inatçı, yaygın diş eti iltihabı vardır ve dişler erken yaşlarda düşer (Healy, 1992; Tajima ve ark., 1993; Anonim2, 2000; Kijias ve ark., 2000). Bunun dışında sindirim kanalını kaplayan mukoza üzerinde geniş ülserleşmiş hatta kangrenleşmiş alanlar, nekrotik ileum yangısının görüldüğü ciddi bakteriyel enfeksiyonlar vardır (Agerholm ve ark., 1993). BLAD'lı buzağılarda şiddetli ve iyileşmeyen ishal görülür (Kehrli ve ark., 1992b).

Solunum sistemi hastalıkları, hem süt sığircılığında hem de besi sığircılığında yaygın ve ciddi ekonomik kayıplara neden olurlar (Soethout ve ark., 2002). BLAD'lı buzağıların solunum sistemlerinde şiddetli pnömoni, bronşit ve yaygın kronik bronkopnömoni vardır (Healy, 1992; Gerardi, 1996; Johnson, 2000; Kehrli ve ark., 2000).

BLAD'lı buzağılarda sık sık deri lezyonları görülür. Ektoparazit invazyonlarına karşı daha duyarlıdırlar (Jánosa ve ark., 1999). Bu klinik belirtilerin görüldüğü buzağılar, antibiyotik sağaltımına yanıt vermezler. Uygulanan sağaltım sonrasında klinik belirtiler ortadan kalksa bile kısa sürede tekrar ortaya çıkar (Olchowy ve ark., 1994; Spes ve ark., 1999; Anonim4, 2000).

Periferal kandan aralıklı olarak yapılan kan sayımında sürekli bir lökosit artışı saptanır. Lökositlerin hemen tamamı nötrofil lökositlerdir (Healy, 1992; Agerholm ve ark., 1993; Tajima ve ark., 1993). Sağlıklı bir sığırın 1mm^3 kanında ki lökosit sayısı 8 000 adet iken, hasta buzağılardan alınan 1mm^3 kanda bu sayı 100 000'den fazladır (Kehrli ve ark., 1992a; Tajima ve ark., 1993; Olchowy ve ark., 1994; Sağlam, 1997 s;212; Kehrli ve ark., 2000). Hatta 8 aylık yaşta BLAD'lı bir Holstayn dişi danada yapılan kan sayımında nötrofil sayısı 300 000 adet / mm^3 olarak bulunmuştur (Nagahata ve ark., 1998b).

Cox ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada BLAD allele'ine homozigot olarak sahip iki düvede lökosit sayımı yapmışlardır. Yapılan lökosit sayımında, nötrofillerin normalden 10 kat, monositlerde ise 5-6 kat bir artış görülmüştür. Lenfosit miktarları normale yakın olarak gözlenmiştir. Ancak incelenen her iki düvede de ne ateş ne de daha önce bildirilen diğer BLAD semptomları gözlenmemiştir (Gilbert ve ark., 1993; Cox ve ark., 1997).

Başa nötrofil lökositler olmak üzere lökositlerin trans endotelial bölgeye göçünün engellenmesi, BLAD'lı buzağılarda görülen klinik belirtilerin ortayamasına neden olur. Mikroorganizmaların yerlestiği enfeksiyon bölgelerinin histolojik incelenmesinde, bu bölgelerin etrafındaki kapiller damarlar, sinüzoitler ve vücuttaki bütün kan damarlarının içinde bol miktarda nötrofil lökosit varken, lezyonlu mukoza yüzeyindeki ülseratif lezyonlarda nötrofil lökositler yoktur ya da çok azdır. Elektron mikroskopuya incelenen nötrofillerde herhangi bir yapısal anormallik belirlenemez (Kehrli ve ark., 1992c).

Kalıtsal bozukluğa homozigot olarak sahip buzağılarda büyümeye geriliği ve aşırı zayıflık vardır. Bu buzağıların canlı ağırlıkları beklenen vücut ağırlığının ancak %50-60'ı kadardır (Anonim2, 2000; Anonim4, 2000; Kehrli ve ark., 2000). BLAD'lı buzağıların günlük canlı ağırlık artışı 0,3 kg/gün iken sağlıklı buzağılarda 0,6 kg/gün olarak belirlenmiştir (Jánosa ve ark., 1999). Agerholm ve arkadaşları (1993) BLAD olduğunu belirledikleri iki Holstbyn buzağı ile aynı çiftlikteki normal yaşıtlarını 42., 70. ve 210. günlerde canlı ağırlıklarını karşılaştırmışlardır. Yapılan karşılaştırma sonunda 210. günde normal buzağıların BLAD'lı buzağılardan 93 kilo daha fazla canlı ağırlığa sahip olduklarını belirlemiştir. Ayrıca BLAD'lı buzağılarda, apse, kronik pnömoni, oral boşlukta ülseratif granülamatöz yangı, periodontitis ve diş kaybı da görülmüştür.

BLAD'ın sebep olduğu enfeksiyonlardan ölen buzağıların otopsilerinde, solunum ve sindirim sistemlerinin mukozalarında yaygın ülseratif hatta gangrenöz lezyonlar,

dalak büyümesi ve vücuttaki yağ dokunun oldukça azalmış olduğu görüllür (Olchowy ve ark., 1994).

Hastalığın prognozu kötüdür, hasta buzağılar genellikle doğumumu takip eden ilk birkaç hafta içinde yaygın ve tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlar sonucu ölürlər (Healy, 1992). Fakat enfeksiyonların yaygınlığı ve etkilenen organların etkilenme derecesine bağlı olarak ölüm bir yaşına kadar ertelenebilir (Fésüs ve ark., 1999; Anonim2, 2000).

BLAD'lı buzağıların ölməsinə neden olan hastalığın sebebi normal florada bulunan mikroorganizmalar olabilir. Hasta buzağılar ancak yoğun bir tibbi müdahale ve özel bakımla iki-üç yaşına kadar yaşayabilir. Ancak bu hayvanlarda ileri düzeyde büyümə geriliği ve sık sık tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlar görülür. BLAD'lı hayvanlar steril bir ortam sağlanırsa ergenliğe ulaşabilirler (Powell ve ark., 1996; Fésüs ve ark., 1999). Ergenliğe ulaşan hayvanlar kesinlikle kızgınlık göstermezler (Jánosa ve ark., 1999).

Resesif otozomal BLAD bozukluğuna homozigot olarak sahip buzağılar, dünyanın her yerinde aşırı zayıflık ve büyümə geriliği ile göze çarpar (Kehrli ve ark., 1992b; Jánosa ve ark., 1999). Bir Holştayn buzağısında, doğumumu takiben bir iki ay içerisinde görülen irinli dış eti yangısı, büyümə geriliği, sık tekrarlayan ishal ve antibiyotik tedavisine cevap vermeyen bakteriyel enfeksiyonlarla karşılaşıldığında daima akla BLAD gelmelidir (Jánosa ve ark., 1999).

1.6. Hasta ve Taşıyıcıların Belirlenmesi

İnsanlarda 500'den fazla monogenik kalıtsal bozukluk tanımlanmıştır. Hayvanlarda ise genetik temeli bilinen kalıtsal bozukluk sayısı çok daha azdır (Muraeedharan ve ark., 1999).

Kalıtsal bozukluklar çoğunlukla resesif otozomal kalıtım şekli gösterirler, bu nedenle de belirlenmeleri zordur. Hayvan yetiştirciliğinde kalıtsal bozuklukları belirlemek önemlidir. Özellikle, yetiştirilen damızlık adayının büyük ekonomik kayba neden olmadan erken yaşta belirlenmesi çok daha önemlidir (Muraeedharan ve ark., 1999).

BLAD gibi resesif kalıtım yolu izleyen kalıtsal bozukluklar fenotipe bakılarak belirlenemez. Bu nedenle gen frekanslarının oldukça yüksek olmalarına karşın BLAD nedeniyle ölen hayvanların sayıları az zannedilir. Bu da çok sayıda hayvanın kesin tanısı yapılamadan BLAD'ın neden olduğu genel enfeksiyonlardan dolayı öldüğü fikrini akla getirmektedir (Özbeyaz, 1997).

Heterozigot bireyler, genotiplerinde hem normal CD18 allelini hem de mutant D128G allelini taşırlar. Bu nedenle bu kalıtsal bozukluğun yayılmasında heterozigot damızlıklar çok önemlidir. Heterozigot bireylerin kan sayımları yapıldığında, lökosit miktarı normalden biraz yüksek bulunur. Fakat lökosit sayısındaki bu farkın D128G alellinden mi yoksa bireysel özelliklerden mi kaynaklandığı kesin olarak belirlenemez. Bununla birlikte heterozigot bireyler herhangi bir klinik belirti göstermeden yaşamlarını normal olarak sürdürürler. Bu nedenle heterozigot bireylerin fenotipik olarak belirlenmeleri zordur. Heterozigotlar fenotipik olarak belirlenemedikleri için sahip oldukları mutant alleli bir sonraki generasyona geçirme olasılıkları % 50 dir. Dolayısıyla kalıtsal BLAD bozukluğunun yayılmasının önlenmesinde heterozigotların belirlenip ayrılması önemlidir (Anonim 5, 2000). BLAD'lı hasta buzağılarda tipik klinik belirtiler yoktur. Fakat hastalık Holstayn populasyonu için potansiyel bir tehlikedir. Bu nedenle BLAD'ı heterozigot olarak genotipinde bulunduran taşıyıcıların belirlenmesi hasta buzağıların belirlenmesinden çok daha önemlidir. Damızlıklar arasında BLAD taşıyıcılarının belirlenerek damızlıktan uzaklaştırılması gereklidir (Cox ve ark., 1997).

1.6.1. Pedigri Analizi

Bir hayvana ait pedigree bilgileri araştırcıya, fenotipte görülen özellik yönünden ferdin homozigot dominant mı yoksa heterozigot mu olduğunu belirlemeye yardımcı olabilir (Nicholas, 1996, s.:157).

Pedigri analizi, bir hayvanın kalitsal bozukluğa sebep olan resesif alleli genotipinde bulundurup bulundurmadığının tahmin edilmesine yardım edebilir (Van Vleck ve ark., 1987, s.:169).

Pedigri analizi yapılırken başlangıçta incelenen ferdin aile ağacı çizilir. Kehrli ve arkadaşları, hasta hayvanların pedigrlilerini 5 generasyon geriye doğru incelediklerinde hepsinde ortak atalar olduğunu görmüşlerdir. Bu ortak ataların, A.B.D.'de ki suni tohumlamada en yaygın kullanılan üstün boğalar oldukları görülmüştür (Kehrli ve ark., 1992a; Kehrli ve ark., 1992b; Shuster ve ark., 1992).

A.B.D. de BLAD'lı buzağıların pedigrlileri geriye doğru incelediğinde BLAD'lı buzağıların hepsinin 1952'de doğan Osborndale Ivanhoe isimli boğa ile hem anne hem de baba tarafından akraba oldukları ve bu boğadan kalma mutant genin anne baba tarafından yavruya aktarılması sonucu doğdukları belirlenmiştir (Mirck ve ark., 1995; Kaneko ve ark., 1997; Kehrli, 2000).

BLAD ilk olarak A.B.D. de ortaya çıkışına rağmen bu ülkeden diğer ülkelere damızlık Holştayn sığır ve donmuş sperma ihracatı ile yayılmıştır. Şu anda dünyanın her yerinde BLAD vakalarına rastlamak mümkündür (Fésüs ve ark., 1999). A.B.D. de hasta buzağıların pedigrlileri incelediğinde hepsinin, Osborndale Ivanhoe, Penstate Ivanhoe Star ve Carlin M Ivanhoe Bell gibi, Holştayn sığır ırkın en seçkin boğaları ile akraba oldukları belirlenmiştir. Daha sonra, A.B.D.'de damızlık olarak en yaygın bu üç boğanın donmuş spermaları moleküler tekniklerle incelediğinde, mutant D128G alelini taşıdıkları belirlenmiştir (Kehrli ve ark., 1992a; Shuster ve ark., 1992; Powell ve ark., 1996).

BLAD'a neden olan mutant allele ilk olarak 1952 yılında doğan Osborndale Ivanhoe isimli boğada ortaya çıkmıştır (Shuster ve ark., 1992; Mirck ve ark., 1995; Powell ve ark., 1996).

Osborndale Ivanhoe isimli boğa Holştain ırkının babası olarak isimlendirilmiştir (Jánosa ve ark., 1999). Mükemmel süt verim kapasitesine sahip oldukları ve bu özelliklerini yavrularına geçirebildikleri için hem kendisi hem de birçok oğlu ve torunu damızlık boğa olarak kullanılmıştır. Bu sayede resesif BLAD alleli A.B.D. de ki Holştain populasyonuna ve buradan da tüm dünyaya kolaylıkla yayılmıştır (Shuster ve ark., 1992; Jánosa ve ark., 1999).

A.B.D. de birçok inek, bu boğaların spermalarıyla tohumlanmıştır. Gerek bu boğaların spermaları ile gerekse bunların yavrularının damızlık olarak kullanılması sonucu hastalık tüm dünyaya yayılmıştır. Dolayısıyla bu boğalarla akrabalıkları olan boğa ve ineklerin taşıyıcı olma olasılıkları yüksektir (Shuster ve ark., 1992; Nagahata ve ark., 1997).

Japonya da 1983-1995 yılları arasında doğan BLAD vakalarının pedigrlileri incelendiğinde bunların Japonya da en çok kullanılan 5 boğa ile akraba oldukları ve bu boğalarında Osborndale Ivanhoe ile genetik bağlarının olduğu belirlenmiştir (Nagahata ve ark., 1997). Aynı şekilde Avrupa da ki hasta buzağıların pedigrlileri incelendiğinde Osborndale Ivanhoe isimli boğaya ulaşılmıştır.

Danimarka'da NJY Huber isimli boğanın 1991 yılında doğan tüm yavrularının %17'si hasta olarak doğmuştur. Bu boğanın 1183 çiftleşmesinin 820 si "Taşıyıcı x Taşıyıcı" çiftleşmesi olduğu belirlenmiştir. BLAD'ın Danimarka'da yayılmasının başlıca sorumlusu bu boğadır (Shuster ve ark., 1992; Gerardi, 1996).

Muhtemel BLAD vakalarının tanısında klinik belirtiler, laboratuar bulguları ve pedigri bilgileri birleştirilir. Hastalık otozomal resesif kalıtsal bir hastalık olduğu için hasta hayvanların pedigrlilerinin incelenmesi tanıda önemlidir (Gilbert ve ark., 1993).

1.6.2. Test Birleşirmeleri

Resesif zararlı genleri taşıyan heterozigot bireylerin belirlenmesinde kullanılan diğer bir yöntemdir. Erkek damızlıklar dışılere göre daha fazla sayıda yavru verdiklerinden genotiplerinde bulunan resesif zararlı geni yeni generasyona yayma olasılığı daha yüksektir (Alpan ve ark., 1990). Bu nedenle yöntem boğa adaylarında kullanılır.

Zararlı resesif geni bir boğanın taşıdığını test etmek için yapılan test birleşirmeleri üç farklı yöntemle yapılır.

- I. Resesif homozigot bireylerle birleştirme
- II. Heterozigot olduğu bilinen bireylerle birleştirme
- III. Olası ebeveyni yavrularıyla birleştirme

I- Resesif Homozigot Bireylerle Birleştirme; Bu yöntem eğer zararlı gen bireylerde çok önemli problem oluşturmazsa kullanılabilir. Bu gibi durumlarda zararlı geni homozigot olarak taşıyan dişi hayvanlar sürüde tutulabilir (Alpan ve ark., 1990). Ancak BLAD da zararlı gene homozigot olarak sahip olan bireyler ergenliğe ulaşamadan ölürlər. Bu nedenle bu yöntem BLAD'ın belirlenmesinde kullanılamaz.

II- Heterozigot Olduğu Bilinen Bireylerle Birleştirme; Zararlı genin heterozigot olarak bulunması canlıda bir problem oluşturmazsa bu birey sürüde tutulabilir. BLAD genini heterozigot taşıyan sıgiurlarda herhangi bir problem görülmez, bu nedenle sürüde tutulur. Bu yöntemde BLAD yönünden test edilmek istenen boğa adayı heterozigot ineklerle çiftleştirilerek bu çiftleştirmeden elde edilecek yavrular incelenir (Alpan ve ark., 1990).

Eğer, denenen erkek heterozigotsa ve heterozigot olduğu bilinen bir dişi ile birleştirildiğinde doğacak yavrunun normal görünüslü olma olasılığı $\frac{3}{4}$ tür, yani %75'dir. İstatistikî olarak 0,05 güven eşiği için 11 yavru, 0,01 güven eşiği içinse 16 normal görünüslü yavru elde edilmesi gereklidir (Alpan ve ark., 1990).

III- Olası Ebeveyni Yavrularıyla Birleştirme; Eğer heterozigot olarak BLAD geni taşıyan inek sürüde yoksa, bu durumda iki aşamalı test birleştirmesi yapılabilir. Ancak doğal olarak da sonuç almak daha uzun sürer. BLAD yönünden test edilecek erkek damızlık adayları normal dişilerle birleştirilir. Eğer baba heterozigotsa elde edilen normal görünüslü yavruların yarısı homozigot normal, yarısı da heterozigot normal olacaktır. Bu birleştirmeden elde edilen normal görünüslü dişi yavrular babayla tekrar birleştirilir. Bu birleştirme sonunda erkek damızlık için 3 normal, 1 kusurlu yavru elde edilir. Bu nedenle 8 torundan 7'si normal 1 tanesi kusurlu olur. Yani oran 7/8'dir. Bu birleştirmede istatistik 0,05 güven eşiği için 23, 0,01 güven eşiği için 35 normal yavru elde edilmesi gereklidir (Alpan ve ark., 1990).

Test Birleştirmeleri Yönteminin Dezavantajları; 1- Bu yöntem de genç bir erkek damızlık adayının belli bir zararlı geni resesif olarak taşıyıp taşımadığını tespit etmek için uzun bir zaman gereklidir (Alpan ve ark., 1990). 2- Test birleştirmeleri çok miktarda emek, para ve zaman gerektirir (Nicholas, 1996, s.:207). 3- Test birleştirmeleri sonucunda bir damızlık baba adayının homozigot olarak sağlıklı olduğunu asla ispat edilemez. İstatistik olarak normal olduğu kabul edilen bireylerde bile düşük seviyede tespit edilememiş taşıyıcı olma olasılığı hala vardır (Nicholas, 1996, s.:208).

Wriedt ve Mohr, sığırlarda letal faktörler üzerinde yaptıkları çalışmalar sonucunda, damızlık boğaların kalitsal kusurlara ait genleri taşıyıp taşımadıklarını anlamak için, her bir boğanın en az 20 öz kızı ile birleştirilmesinin gerektiğini söylemişlerdir. Bu sayede boğaların %95 olasılıkla taşıyıcı olup olmadıkları anlaşılmaktadır (Arıtürk, 1977).

1.6.3. Biyokimyasal Tanı

Kalitsal bozukluk bir protein eksikliğine neden olur ve bu eksik protein kan ve diğer dokulardan uygun bir laboratuar testi ile belirlenebilir ise biyokimyasal tanı

konabilir. Biyokimyasal tanı ancak hasta ve normal bireylerin belirlenmesinde kullanılabilir (Nicholas, 1996, s.:208). Çünkü çeşitli non-genetik faktörler ve genomun diğer lokusundaki genlerden dolayı bir ırk içinde incelenen protein ve enzim seviyesinde sık sık önemli varyasyonlarla karşılaşılır. Bazı hayvanlardaki enzim seviyesi normal ve taşıyıcı genotipler arasında bir seviyede olabilir. Böyle durumlarda karar vermek güçtür (Nicholas, 1996, s.:208).

1.6.4. Sitolojik Tanı

BLAD'ın sitolojik tanısında “Flow Sitometri” testi kullanılabilir (Tammen ve ark., 1996; Kehrli, 2000). İnsanlarda LAD vakalarında nötrofillerdeki CD18 seviyeleri normal insanlardakinin %0-10 seviyesinde olduğu bildirilmiştir (Cox ve ark., 1997). Aynı durum sıgırlar içinde geçerlidir. Flow sitometri ile hasta buzağıların nötrofillerindeki β_2 integrin miktarının olması gerekenin yaklaşık %2'si kadar olduğu belirlenir (Kehrli ve ark., 1992c; Ackerman ve ark., 1993a). Heterozigot hayvanların pedigrileri incelendiğinde BLAD taşıyıcısı bir boğa ile akrabalığı belirlenip flow sitomeric ile β_2 integrin miktarları ölçülecek taşıyıcı tanısı konabilir (Kehrli ve ark., 1992c; Cox ve ark., 1997). Ancak bu tanı yöntemi ile elde edilen sonuç her zaman şüpheli kabul edilmelidir.

Bu yöntem ile hasta ve sağlıklı bireyler belirlenir. Heterozigot bireyler kesin olarak belirlenemez. CD18 glikoprotein miktarı için fertler arasındaki ferdi farklılıklar da tanıyı güçleştirir. β_2 integrinler yüksek bir düzen gösterirler ancak bireysel değişiklik gösterme olasılığı da yüksektir. Bu da flow sitometri yöntemi ile BLAD taşıyıcılarının belirlenmesini güçleştirir (Cox ve ark., 1997). Ayrıca flow sitometrinin yapılabilmesi için oldukça gelişmiş laboratuarların kurulmuş olması gereklidir. Yani oldukça pahalı bir yöntemdir.

Bu test hücre zarında CD18 glikoproteini bulunduran lökositlerin sayılması ve bununda yoğunluk olarak gösterilmesi esasına dayalı bir testtir. Ancak bu yöntem rutin kullanım için uygun değildir (Ackerman ve ark., 1993b).

Flow sitometri metodu ile hücre zarındaki CD18 bağlanma glikoproteinlerinin varlığı ya da yokluğu tespit edilir. Metodun çalışma prensibi şöyledir. Bir toma lamında şüpheli fertten elde edilen lökositler sayılır ve sayılan lökositler bir hücre süspansiyonu haline getirilerek bir tüpte toplanır. Hücre süspansiyonu halindeki lökositler ince bir pipet yardımıyla iyice karıştırılarak her bir lökosit hücresinin birbirinden tamamen ayrılması sağlanır. Daha sonra hazırlanan lökosit süspansiyonun üzerine, lökositlerin hücre zarında bulunması gereken β_2 integrin glikoproteinlerine karşı hazırlanmış ve primer antikor olarak adlandırılan antikor ilave edilir. İşlem sonunda şüpheli bireyin lökosit hücre zarı üzerinde bulunması gereken β_2 integrin glikoproteinleri ile buna karşı hazırlanmış olan antikorun bağlanması beklenir. Bu işlemden sonra hücre zarındaki “glikoprotein + primer antikor” kompleksiyle bağlanan ve özel olarak floresan bir boyaya işaretlenmiş olan bir başka antikor (sekonder antikor) hücre süspansiyonu üzerine ilave edilir. Eğer lökositlerin üzerinde β_2 integrin glikoproteinleri varsa “glikoprotein + primer antikor” kompleksi, son olarak eklenen floresan boyaya ile işaretli sekonder antikorlar ile birleşeceklerdir. Eğer lökositlerin hücre zarları üzerinde β_2 integrin glikoproteinleri yoksa primer antikorlar hiçbir yere bağlanamayacaklardır. Sonuçta flüoresan boyaya ile işaretlenmiş sekonder antikorlarla primer antikorlar bağlanamayacaklardır. Oluşan antijen, antikor bağlanma işlemlerinden sonra süspansiyon haldeki hücreler sadece tek bir hücrenin geçebileceği kadar dar ucu bir kanaldan geçirilir. Hücreler kanaldan geçerken kanala lazer ışığı verilir. Eğer floresan boyalı sekonder antikorla birleşmiş “glikoprotein + primer antikor” kompleksi varsa tek bir lökosit hücresinin geçebileceği kadar dar uctan geçerken bu uca verilen lazer ışığı sayesinde floresan boyaya parlar. Meydana gelen parıldama sisteme bağlı bir bilgisayarda kayıt edilir. Eğer lökosit hücre zarında primer antikorun bağlanacağı glikoprotein yoksa bağlanma olmayacağı için floresan parlama da olmayacağıdır. Kanaldan daha önce sayılış过的 olan lökositlerin hepsi teker

teker geçirilir ve parlak floresan ışık yayan her bir lökosit hücresi sayılır. Elde edilen her parıldama, uca bağlı bulunan ve yönteme ait bir program yüklenmiş olan bilgisayara kaydedilir. Geçen her lökosit hücresi sonunda parıldama olup olmadığı bilgisayara girer ve sonuç yoğunluk olarak alınır. Şüpheli bireyden elde edilen flow sitometri sonuçları ile kontrol olarak kullanılan normal bireylerin lökositlerinin verdiği sonuçlar karşılaştırılır. Bu şekilde şüpheli bireylerin hasta ya da sağlıklı olduğu sonucuna varılır (Uysal, 1995).

1.6.5. Moleküler Tanı

Yetiştiriciler için bir populasyondaki istenmeyen bir genotipin, erken yaşlarda belirlenip elimine edilmesi önemlidir. Bu da ancak canlıya ait çeşitli doku parçalarından elde edilen DNA kullanılarak yapılan moleküler yöntemlerle sağlanabilir (Ryncarz ve ark., 1995).

Evcil hayvanlardaki kalıtsal bozuklukların moleküler düzeyde identifikasiyonu alanında 1980'lerden itibaren önemli gelişmeler sağlanmıştır (Fries ve Ruvinsky, 1999, s.:123). Moleküler tekniklerde kullanılan materyal DNA, RNA ve proteinlerdir. Teorik olarak her doku örneği DNA kaynağı olarak kullanılabilir (Phillips, 1990).

Kalıtsal bozuklukların moleküler tanısında, çift yumurta ikizliği durumunda, ikiz kardeşler arasında korioallontoik damar anastomozları nedeniyle hemopoetik sistem hücrelerinin değişmesine neden olabilen hemopoetik kimerizim olabileceği bir hata kaynağı olarak düşünülmelidir. Homozigot normal ve hasta ikizlerin kan örnekleri incelendiğinde her iki kardeşte heterozigot tanısı konabilir. Bu nedenle ikiz kardeşler arasında hastalığı moleküler yöntemler ile doğru tanımlayabilmesi için moleküler testlerde örnek olarak kıl kökü, sperma ya da doku örnekleri kullanılmalıdır. Ancak genel olarak BLAD'in kesin tanısı için geliştirilen DNA temelli moleküler genetik tekniklerde yaygın olarak hayvanlardan alınan kan kullanılır (Ryncarz ve ark., 1995).

Hastalığın yaygınlığını azaltmak için hasta ve taşıyıcı hayvanların doğru olarak tanımlanması gereklidir. Bu da ancak son yıllarda geliştirilen PCR'ı takiben yapılan Restriksiyon Parçacık Büyüklük Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) ve PCR'ı takiben yapılan Ligaz Zincir Reaksiyonu (Ligase Chain Reaction, LCR) gibi moleküler yöntemlerle belirlenebilir (Jáñosa ve ark., 1999). Bu sayede böyle resesif otozomal kalıtsal bozuklukların taşıyıcıları kesin olarak belirlenerek populasyondan uzaklaştırılabilir.

Moleküler tanı metotları heterozigotların belirlenmesine ve “Heterozigot x Heterozigot” birleşirmelerin engellenmesini sağlar. Bu sayede suni tohumlamada kullanılan ya da kullanılmak istenen boğalar incelenen kalıtsal hastalık yönünden kesin olarak belirlenir. Eğer üstün bir boğa test edilip heterozigot olduğu kesin belirlenirse bu boğadan elde edilen spermalarla sadece homozigot normal ineklerin tohumlanır veya boğa damızlıktan çıkarılır. Doğan yavrular tekrar test edilerek BLAD yönünden genotipi belirlenebilir ve sonuç kaydedilir (Anonim 2, 2000).

BLAD'ın tanımlanmasından sonra, bozukluğu tespit etmek için çeşitli metotlar geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden ilki lökositlerin hücre zarları üzerindeki CD18 bağlanma glikoproteinlerinin belirlenmesi esasına dayalı biyokimyasal tanıdır. Ancak bu yöntem ile sadece hasta hayvanlar tanımlanabilir.

BLAD allelinin belirlenmesi için DNA kullanılarak yapılan test, ancak 1992 yılında geliştirilmiştir. BLAD'ın genetik temelinin aydınlatılmasından sonra geliştirilen ve DNA kullanılarak yapılan testler, hasta, normal ve taşıyıcı hayvanların ayırt edilmesinde en çok kullanılan testler olmuştur. Holtayn sığır ırkında, BLAD'a neden olan mutant allelin kesin olarak tanınmasını sağlayan moleküler genetik testler geliştirilene kadar, taşıyıcılar uzun yıllar belirlenmemiştir (Powell ve ark., 1996). BLAD'ın tanısında DNA kullanılarak yapılan moleküler tanı yöntemleri klasik tanı yöntemleriyle karşılaştırıldığında daha doğru, daha ucuz, daha hızlı ve daha kesin sonuç verirler (Anonim2, 2000).

BLAD'ın klinik belirtileri oldukça iyi açıklanmıştır. Sahada çalışan veteriner hekimlere hayvanın yaşı, tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlar, lökosit sayısı ve hayvanın pedigrisinin incelenmesi hasta buzağıların tanısında yardımcı olabilir. Ancak normal görünüşlü hayvanların bir kısmı klinik olarak herhangi bir belirti göstermeyen heterozigot bireylerdir.

Almanya'da 1996 yılında yapılan bir çalışmada toplam 2381 Holştayn sığır incelenmiştir. İncelenen hayvanların 186 tanesinin klinik belirtilere göre BLAD taşıyıcısı olduğu düşünülmüştür. PCR/RFLP incelemesi sonunda bu şüpheli hayvanların 69 tanesinin (%37,1) hasta, 13 tanesinin (%7) taşıyıcı ve 104 tanesinin de normal olduğu belirlenmiştir. Klinik yönden herhangi bir belirti göstermeyen 2195 damızlık boğa adayından 283'ünün BLAD taşıyıcısı olduğu ve 1957 hayvanın ise homozigot normal olduğu belirlenmiştir (Tammen ve ark., 1996).

A.B.D.'de ve Almanya'da 1977-1992 yılları arasındaki granülositopati sendromundan şüphelenilen sığırlara ait örnekler incelenmesi sonucu çoğunun BLAD yönünden homozigot oldukları belirlenmiştir (Kehrli ve ark., 1992b).

BLAD allelini belirlemek amacıyla yapılan moleküler testler kesin sonuç verir ve nispeten diğer yöntemlere göre ucuzdur. Irka özgü ve sadece Holştayn sığır ırkında görülen bir kalıtsal bozukluk olan BLAD yönünden tüm suni tohumlama boğaları ve ebeveynleri moleküler tanı yöntemleri ile test edilmelidir. Eğer boğa adaylarının anneleri test edilmez ise boğa adaylarında bu allelin olma riskini azaltmak için aday 6-7 generasyon geriye gidilerek pedigri incelenmelidir. Boğa adaylarının anne bir kardeşlerinde ve annenin yakın akrabalarında, homozigot BLAD görülenler ve taşıyıcı var mı? yok mu? taranmalıdır. Sonuçta annelerin BLAD durumları belirlenmelidir (Powell ve ark., 1996; Anonim 2, 2000; Anonim 3, 2000).

1.6.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Takiben Yapılan Restriksiyon Parçacık Büyüklük Polimorfizmi (RFLP) ile BLAD Allelinin Belirlenmesi

Hastalık sebebinin CD18'i kodlayan gende meydana gelen bir nokta mutasyonu olduğunun 1990 yılında Kehrli ve arkadaşları tarafından belirlenmesinden sonra 1992'de CD18 glikoproteinini kodlayan genetik kod Schuster ve arkadaşları tarafından çözülmüştür. Bu araştırcı tarafından mutant CD18 ve normal CD18 genlerinin genetik şifresinden primerler hazırlanarak PCR reaksiyonlarında primer olarak kullanılmaya başlanmıştır (Zsolnai ve Fèsüs, 1996; Kaneko ve ark., 1997).

Tek bir gende meydana gelen mutasyon sonuca çıkan bu kalıtsal bozukluk PCR ile birlikte yapılan RFLP ile belirlenir. Tanı için ilk olarak özel primerler kullanılarak yapılan PCR sonunda elde edilen ürünler, BLAD için *Taq I* ve *Hae III* restriksiyon enzimleri ile kesilir. Bu işlem sonunda elde edilen ürünlerde restriksiyon bölgelerinin varlığı veya yokluğuna göre hasta, normal ve taşıyıcı bireyler belirlenir (Poli ve ark., 1996; Tammen ve ark., 1996).

PCR da kullanılacak olan DNA, şüpheli bireylerden alınacak olan doku örneklerinden, EDTA'lı kan örneğinden ve spermadan elde edilir. Ancak son yıllarda toplamasının kolay olması, uzun süre saklanabilir olması ve dizigotik ikizlik durumunda hemopoetik kimerizm nedeni ile yanlış tanı koyma riskini azaltmak amacıyla PCR için DNA kaynağı olarak kıl kökü kullanılması önerilmektedir (Healy ve ark., 1995). Alınan kıl köklerinin diğer hayvanlara ait kıl kökleri ile karışmamasına dikkat edilmelidir.

PCR; DNA veya RNA baz sıralarının sayısal olarak artırılması temeline dayanan bir tekniktir. BLAD'ın PCR'la tanısı ilk olarak 1992'de Shuster ve arkadaşlarının buldukları 5'-GAG TAG GAG AGG TCC ATC AGG TAG TAC AGG-3' ve 5'-T CCG GAG GGC CAA GGG CTA-3' baz dizilerine sahip iki primer kullanılarak yapılmıştır. Bu primerler sayesinde şüpheli bireylerin DNA'larından CD18 genini kodlayan kısım amplifiye edilmektedir (Zsolnai ve Fèsüs, 1996).

PCR sonunda hasta, normal ve taşıyıcı bireylerden 58 bp uzunluğunda tek bir bant elde edilir. Elde edilen bu PCR ürünleri, *Taq I* veya *Hae III* endonükleaz enzimleri ile kesildikten sonra % 4'lük agaroz jel elektroforezine tabi tutulur. Elektroforez sonunda, *Taq I* ile kesilen PCR ürünlerinden BLAD yönünden homozigot normal bireylerde 26 bp ve 32 bp'lik uzunlukları olan iki bant elde edilir. Homozigot normal bireylere ait PCR ürünlerini *Hae III* ile kesildiğinde 9 bp ve 59 bp'lik iki bant elde edilir. Ancak 9 bp'lik bant çok küçük olduğu için genellikle jelden çıkar ve görülmez. BLAD allellerini homozigot olarak taşıyan hasta bireylere ait PCR ürünlerini *Taq I* ile kesildiğinde bu enzimin tanıdığı bölgenin meydana gelen nokta mutasyonu sonucunda ortadan kalkması neticesinde enzim kesemez ve 58 bp uzunluğunda tek bir bant elde edilir. BLAD taşıyıcısı bireylere ait PCR ürünlerinin *Taq I* ile kesildiğinde 26 bp, 32 bp ve 58 bp uzunluklarında üç bant, *Hae III* ile kesilmelerinden ise 9 bp, 19 bp, 30 bp ve 49 bp uzunluklarında dört bant elde edilir (Shuster ve ark., 1992; Jørgensen ve ark., 1993; Kriegesman ve ark., 1997; Zsolnai ve Fèsüs, 1997; Mukhopadhyaya ve ark., 2000). Shuster ve arkadaşlarının geliştirdikleri bu ilk PCR-RFLP yöntemi temel kabul edilerek aynı bölgenin çoğaltıması için farklı primerler kullanan araştırmacılar daha kolay uygulanabilir PCR-RFLP yöntemleri geliştirmiştir.

1.6.5.2. Ligaz Zincir Reaksiyonu (LCR)

LCR, PCR gibi incelenmek istenen örnek DNA'sının miktarını artırabilen bir moleküler genetik tekniği ile birlikte kullanılan metottur. Bu yöntemde incelenmek istenen genin baz dizini bilinmektedir ve bu bilinen baz dizininde meydana gelmiş olan nokta mutasyonu belirlenir. Yöntem, sadece bilinen gendeki tek bir baz değişikliğine neden olan nokta mutasyonlarının tespiti için kullanılmaktadır.

Ligaz enzimi, çift iplikçikli DNA'da meydana gelen tek iplikçikteki kopmalarda oluşan iki uç arasında fosfodiester bağı kurarak kopan uçların bağlanması katalize eden enzimdir. Bu yöntemde termostabil ligaz enzimleri kullanılır. Yöntem, insan

hekimliğinde ilk olarak orak hücreli anemiye sebep olan nokta mutasyonunun tanısında kullanılmıştır. LCR' yi BLAD'in belirlenmesinde ilk kez Batt ve arkadaşları (1994) kullanmıştır.

LCR yönteminde öncelikle; baz dizsinin bilindiği genin mutant ve normal allellerine uygun primerler sentezlenir. Sentezlenen her iki primerin 5' uçları biotinle işaretlenir. Hem normal allele için hem de mutant allele için sentezlenerek işaretlenen bu primerler, kullanılan termostabil bir ligaz enzimi sayesinde şüpheli örneğe ait DNA'da kendilerine uygun bölgeye bağlanır. Yöntem, işaretli primerlerin şüpheli bireylerden elde edilen DNA'lara bağlanıp bağlanamamasına göre tanı yapılması esasına dayanır. İşaretli primerler ile örneğe ait DNA'nın birleşip birleşmediği elde edilen LCR ürünlerinin, biotin ile birleştiğinde mavi renk veren streptavidin boyasıyla kaplı mikropleyt kuyucuklara yüklenerek mavi renk görülmesi ile yapılır.

BLAD tanısında LCR yöntemi kullanılırken önce hem normal, hem de mutant CD18 geni için 5' ucu biotinle işaretli primerler hazırlanır. Hazırlanan işaretli primerler incelenen örnekten elde edilen DNA ile termostabil ligaz enziminin varlığında birleştirilir. Daha sonra işaretli primerler ve örnek DNA'sının bağlanıp bağlanmadığının görüntülenmek amacıyla elde edilen LCR ürünleri streptavidin boyası ile kaplanmış micropleyt kuyucuklarına konur. Biotin ve streptavidinin birleşmesi ile oluşan mavi rengin görülmesi primer, DNA birleşmesinin olduğunu gösterir.

Sadece normal CD18 alleli için hazırlanan işaretli primer ile birleşerek, streptavidin ile kaplı mikropleytlerde mavi renk veren örnek DNA'lar homozigot normal olarak değerlendirilir. Sadece mutant D128G alleli için hazırlanan primer ile birleşerek mikropleyte mavi renk veren örnek DNA'lar homozigot BLAD'lı olarak değerlendirilir. Hem normal CD18 alleli için hazırlanan primer ile hem de mutant D128G alleli için hazırlanan primerle birleşerek mavi renk veren şüpheli DNA'lar ise heterozigot olarak değerlendirilir (Batt ve ark., 1994).

PCR ile birleştirilmiş LCR testi rutin olarak BLAD'ın moleküller tanısında kullanılmaktadır (Kaneko ve ark., 1997). Ancak LCR-PCR yöntemi, PCR-RFLP ile karşılaşıldığında, hem daha pahalı hem de daha fazla emek gerektirmektedir.

Hayvan yetiştiriciliğinde üstün verimli erkek damızlıklardan daha çok yavru elde etmek için suni tohumlama yöntemi geliştirilmiştir. Üstün verimli dişi damızlıklardan daha çok yavru elde etmek için ise embriyo transfer yöntemi kullanılmaktadır. Yukarıda bahsedilen moleküller tanı teknikleri sadece bireylerden değil embriyolarдан elde edilen DNA'lar için de kullanılır. Bu sayede embriyolar BLAD yönünden incelenerek hasta ve taşıyıcı embriyoların transfer edilmesi engellenir. Sadece homozigot normal embriyolar saklanır veya nakledilir. Böylelikle BLAD yönünden taşıyıcı olduğu bilinen fakat üstün verim özelliklerine sahip olan boğa ve inekler embriyo transferinde kullanılabilir. Yetiştiricilere embriyo temin eden firmalar artık, embriyoların alıcıya transferinden önce, BLAD yönünden incelenmesi ve embriyoların cinsiyetlerinin tayin edilmesi rutin olarak uygulanmaktadır (Anonim1, 2000).

1.6.6. Diğer Yöntemler

Steinholt ve arkadaşlarının (1994) yaptıkları çalışmada, BLAD taşıyıcılarının otozomal kromozomlarının BLAD alelini taşımayan sıyırlarından daha küçük olduklarını belirlemişlerdir. Bu farklılığın, sitolojik olarak belirlenmemiş kromozom aberasyonlarından kaynaklanmış olabileceğini bildirmiştir. Aynı araştırmacılar, BLAD alelini homozigot olarak bulunduran hayvanların otozomal kromozomlarının ise taşıyıcılarından da küçük olduğunu belirlemiştir. Ayrıca taşıyıcıların X kromozomlarının, normallerin X kromozomlarından daha küçük olduğunu, Y kromozomlarında ise herhangi bir farkın olmadığını bildirmiştir. Cinsiyet kromozomlarının, BLAD homozigotlarda, BLAD negatiflere ve BLAD taşıyıcılarına göre önemli ölçüde kısalmış olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca BLAD taşıyıcısı boğaların spermatozoalarının normal boğaların spermatozoalarından daha küçük

olduğunu bildirmiştirlerdir. Olası BLAD taşıyıcılarının otozomal kromozomları ile spermatozoonlarının ölçülmesi ve pedigrilerini araştırılmasıyla % 77 doğruluk payıyla önceden tahmin edilebileceğini bildirmiştirlerdir. Nitekim söz konusu araştırcılar 20 Holstain boğadan kan örneği alarak karyotiplerini belirlemiştir ve bu boğaların ikisinin otozomal kromozomlarının diğerlerinden daha küçük olduğunu saptamışlardır. Kromozom boyalarının ölçülmesi ile birlikte yapılan BLAD testinde otozomal kromozomları küçük olan boğalardan birisinin BLAD taşıyıcısı olduğunu bulmuşlardır. Küçük otozomal kromozoma sahip ancak BLAD taşıyıcısı olmayan ikinci boğanın pedigrisi incelemişinde bununda, BLAD taşıyıcısı boğa ile aynı aileden geldiği görülmüştür (Steinholt ve ark., 1994).

Pedigri bilgileri, otozomal kromozom ölçülerini ve spermatozoal ölçüm ile basit ve multiple korelasyon analizleri de kullanılarak BLAD allelinin varlığı tahmin edilebilir (Steinholt ve ark., 1994).

BLAD taşıyıcısı buzağıların büyümelerinde normal buzağılara göre önemli bir farklılık bulunmamaktadır. Bununla beraber BLAD taşıyıcısı buzağıların baş genişliği ve metakarpal uzunluklarında normal buzağılar ile arasında küçük farklılıklar olduğu belirlenmiştir ancak bunun nedeni açıklanamamıştır (Arrayet ve ark., 2002).

BLAD'da nötrofillerin transendotelyal göçü engellenmiştir ancak lenfositlerin, monositlerin ve eozinofillerin transendotelyal göçleri normaldir. Bu nedenle bozukluğun belirlenmesinde nötrofil miktarının tespiti önemlidir. Diğer lökositlerin sayıları önemsizdir. Fakat nötrofil sayılarının artması sadece homozigot hastaların belirlenmesinde önemli olup taşıyıcıların belirlenmesinde araştırcılara yardımcı olamaz (Cox ve ark., 1997).

Pratikte hayvanların BLAD durumlarının önceden tahmin edilmesi çok önemlidir. Çünkü bu sayede ilave bir masrafa gerek duyulmadan büyümeye performansına

bakılarak BLAD taşıyıcısı buzağıların tahmin edilmesi ve sürüden ayıklanması mümkün olabilecektir (Arrayet ve ark., 2002).

En yaygın ve en etkili BLAD tanı yöntemi DNA kullanılarak yapılan moleküller test yöntemleridir. Kullanılan bu test yöntemler sayesinde genç hayvanların genetik yapıları belirlenerek istenmeyen özelliğe sahip olanların erken dönemde sürüden ayıklanması olasıdır. Böylelikle ergenliğe kadar olan bakım ve beslenmenin neden olacağı ekonomik kayıplar önlenmiş olur (Ryncarz ve ark., 1995).

1.7. BLAD’ın Yaygınlığı ve Yayılma Nedenleri

Uygulanan projeni test yöntemleri ve mutant allelin belirlenmesi için geliştirilen modern tanı yöntemlerinin güvenirliği sayesinde teorik olarak BLAD alleli populasyondan tamamen elimine edilebilir. Son yıllarda, dünyada ki Holştayn populasyonunda BLAD taşıyıcılarının oranı gittikçe azalmasına rağmen, tek bir mutant BLAD allelinin varlığı bile bu kalıtsal bozukluğun ortadan kalkmasını engelleyebilir (Fesus ve ark., 1999; Arrayet ve ark., 2002). Geliştirilen PCR-RFLP yöntemlerinin kullanılması ile BLAD taşıyıcıları kesin olarak belirlenebilir ve populasyondan uzaklaştırılabilir (Fesus ve ark., 1999). Buna rağmen dünya Holştayn popülasyonunda BLAD allelinin yayılmasında iki önemli etken rol oynamıştır. Bunlardan birincisi modern süt sığircılığında yaygın olarak uygulanan suni tohumlama metodu, diğer ise kalıtsal bozukluk olarak BLAD’ın tanımlandığı dönemde yanlış olarak BLAD alleli ile verim özelliklerini arasında pozitif bir ilişkinin olduğunu düşünülmüşdür.

Suni tohumlama, hayvan yetiştiriciliğinde ilk olarak 1700’lü yılların sonunda İtalya’dır uygulanmıştır. Modern hayvan yetiştiriciliğinde ise 1949 yılında gliserol’ün “kroyoprotektan” etkisinin belirlenmesinden sonra yaygın kullanılmaya başlanmıştır. Gelişen suni tohumlama yöntemi modern süt sığırı yetiştiriciliğinde önemli bir uygulama alanı bulmuştur. Bu yöntem kızlarının laktasyon performansı göz önünde

tutularak daha kolay boğa seçimine imkan verir. Bu sayede genetik olarak süper birkaç boğa yaygın olarak kullanılır (Shuster ve ark., 1992). Suni tohumlama istasyonlarında üstün verim özelliklerine sahip boğalardan sağlanan spermalar, boğalar öldükten sonra tohumlamada kullanılır. Böylelikle bu hayvanların yavrularının sayısı çok büyük rakamlara ulaşır (Muraeedharan ve ark., 1999). Uygulanan suni tohumlama yöntemi sayesinde geçen birkaç 10 yıl boyunca Holştayn sığırlarının süt üretim kabiliyetleri yaklaşık 900 kg artmıştır. Fakat bu yöntem sayesinde ırk içindeki bireyler arasında ki genetik akrabalık da artmıştır. Artan akrabalık BLAD gibi resesif genetik bozuklukların fenotipte ortaya çıkışmasına neden olmuştur (Shuster ve ark., 1992; Jánosa ve ark., 1999). Dünyadaki süt endüstrisinde kullanılan süt ineklerinin ve A.B.D.'de ki 10 milyon süt ineğinin yaklaşık % 70'i suni tohumlama yöntemi ile tohumlanmaktadır (Kehrli ve ark., 1992a; Ryncarz ve ark., 1995). Ancak bu metot, tek bir hayvandan elde edilen verimi artırırken önemli ekonomik kayıplara neden olabilen BLAD, üridin monofosfat senteaz yetmezliği (Deficiency of Uridine Monophosphate Senteaz, DUMPS) gibi kalıtsal bozuklukların tüm populasyona yayılmasına da aracılık edebilir.

Suni tohumlamanın süt sığırı yetiştirciliğinde yaygın bir şekilde kullanılması, süt sığırcılığında genetik bozuklukların neden oldukları ekonomik kayıplar konusunun önemini artırmıştır. Çünkü BLAD örneğinde olduğu gibi üstün verimli tek bir boğanın suni tohumlama ile yoğun kullanılması, boğanın genotipinde bulunan zararlı bir genin populasyonda çok hızlı yayılmasına neden olabilmektedir (Muraeedharan ve ark., 1999).

Dünyada Holştayn populasyonunun yaklaşık % 5,8'i BLAD, suni tohumlamada kullanılan damızlık boğaların, yaklaşık % 7'si ineklerin ise yaklaşık % 2'si DUMPS yönünden taşıyıcıdır. Ayrıca bir başka otozomal resesif bozukluk olan citrullinemia da Avustralya Holştaynlarında yaygındır (Mirck ve ark., 1995; Jánosa ve ark., 1999).

BLAD'ın dünyada ki Holştayn populasyonunda hızla yayılmasının bir diğer nedeni de bazı yetiştiriciler ve araştırmacıların, BLAD'ın ilk olarak tanımlandığı

yıllarda BLAD taşıyıcılarının verim özellikleri yönünden homozigot normallerden daha üstün olduklarıına inanmalarıdır. Taşıyıcı boğalar ayıklandığında, bu boğaların sahip oldukları ve BLAD alleli ile ilişkili olduğu düşünülen üstün verim özelliklerinin kayıp olacağuna inanmışlardır. Bu nedenle, BLAD allele frekansının düşürülmesi konusunda araştırcılar görüş ayrılığına düşmüşlerdir. Bazı araştırcılar, taşıyıcıların tamamının ayıklanmasının gerekmeyeğini ileri sürmüşlerdir. Amerikan Holstayn Yetiştiricileri Derneği, 1991 de yaptıkları BLAD kontrol programı ile bu görüşü desteklemiştir. Sonuç olarak, boğa kataloglarında taşıyıcılar BL olarak belirtilerek yetiştirmede kullanılmıştır. Bu düşünce, BLAD'ın yayılmasında önemli olmuştur (Powell ve ark., 1996; Fésüs ve ark., 1999; Jánosa ve ark., 1999).

Powell ve arkadaşları (1996), BLAD allelini taşıyan ve taşımayan boğaların kızlarının, süt verimlerini, sütteki yağ ve protein oranlarını, verimli yaşam sürelerini ve sütteki somatik hücre sayılarını karşılaştırmışlardır. Taşıyıcıların bir laktasyon döneminde genel verim özelliklerinin, BLAD alleline sahip olmayanlardan daha düşük olduğunu bildirmiştir (-18 kg süt verimi, -0,4 kg yağ ve -0,9 kg protein).

Benzer şekilde Fransa'da Boichard ve Amigues (1995) yılında, BLAD geni ve BLAD geni ile ilişkisinin olduğu düşünülen beş verim özelliğini karşılaştırmışlardır. Bu amaçla Fransa da damızlık olarak kullanılan 620 suni tohumlama boğasının kızlarının verimlerini incelemiştir. BLAD geni ve bu verim özellikleri arasında herhangi bir ilişkinin olmadığı sonucuna varmışlardır (Fésüs ve ark., 1999).

Fésüs ve arkadaşları (1999), Macaristan'da BLAD taşıyıcısı 153 boğanın kızları ve homozigot normal boğaların kızlarının süt verimleri, sütteki yağ oranı ve süt proteini verimlerini karşılaştırmışlardır. İncelenen verim özellikleri yönünden homozigot normal olan boğaların kızlarının, BLAD taşıyıcısı boğaların kızlarından üstün olduğu bildirilmiştir.

Holstaynlarda bazı performans özellikleri üzerine BLAD geninin etkisinin olup olmadığını incelenmiş ve günlük ağırlık artışı, yemden yaralanma kabiliyeti ve

ultrasonik kas alanı ölçümünde BLAD genini taşımayanların, BLAD taşıyıcılarından daha iyi oldukları bildirilmiştir (Fésüs ve ark., 1999; Jánosa ve ark., 1999).

BLAD taşıyıcısı ve normal Holşaynların 305 günlük süt verimlerini karşılaştırıldığı bir araştırmada, taşıyıcıların 8309 kg ve normallerin ise 8276 kg süt verim ortalamasına sahip oldukları gözlenmiştir. Aradaki farkın istatiksel olarak önemli olmadığı ve süt verimi üzerine BLAD allelinin etkisinin bulunmadığı bildirilmiştir. (Wanner ve ark., 1999).

Jánosa ve arkadaşları (1999) projeni test verilerini inceledikleri boğalarda, BLAD alleli ile süt verimi, süt yağı ve süt proteinini oranlarını karşılaştırılmışlardır. Sonuçta bir laktasyon dönemi süt verimi yönünden sağlıklı boğaların kızlarının, BLAD taşıyıcılarının kızlarından üstün oldukları bildirmiştir (791 kg'a 774 kg). Süt yağı üretiminde de yine sağlıklıların taşıyıcılarından üstün oldukları belirlemiştir (27,8 kg'a 25,6 kg).

Yapılan çalışmalar, BLAD geninin ekonomik verim özellikleri üzerine herhangi bir pozitif etkisinin olmadığı hatta farklı araştırmacılar tarafından yapılan bu çalışmalarda BLAD allelinin verim için önemli bazı özelliklere olumsuz etkisinin bile olabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle BLAD'a karşı yapılan seleksiyon ile taşıyıcıların ayıklanmasının sürünen ekonomik verim seviyesi üzerine herhangi bir olumsuz etkisi olmayacağı (Fésüs ve ark., 1999; Jánosa ve ark., 1999).

Letal bir otozomal bozukluk olan BLAD, immun sistemini tahrip ederek hayvanların ölümüne neden olmaktadır. Bu bozukluk heterozigotlarda letal değildir. Ancak BLAD genini taşıyan heterozigot hayvanlarda, bu allelin sağlık üzerine etkisi tam olarak anlaşılamamıştır. Araştırmacılar, BLAD ve meme bezi sağlığı arasındaki ilişkiye dikkat çekmişlerdir. BLAD lokusunun immun sistem üzerine belirlenen etkisi göz önünde tutulursa, bu allele yönünden heterozigot hayvanların mastitise dayanıklılığını doğrudan olarak etkileyebileceğini de düşünülebilir. Ancak bu konuda

arastırma yapan Kelm ve arkadaşları (1997), BLAD allele ile klinik mastitis arasında belirgin bir ilişki bulamamışlardır (Wanner ve ark., 1999).

Benzer şekilde Wanner ve arkadaşları (1998), streptokok, stafilocok ve koliform bakterilerden kaynaklanan klinik mastitisin yaygınlığı, ciddiyeti ve süresi üzerine BLAD alleleinin varlığının veya yokluğunun belirgin bir etkisinin olmadığını belirlemiştirlerdir. Taşıyıcılar ve normal hayvanlarda görülen klinik mastitis vakalarının karşılaştırılmasında, mastitisin şiddet, süre ve enfeksiyon frekansı açısından benzer sonuçlar elde edilmiştir (Wanner ve ark., 1999).

Kalitsal bir bozukluk olarak BLAD hastalığı tanınmadan önce A.B.D. de suni tohumlama boğası olarak seçilen en iyi Holstayn boğalarının arasında BLAD taşıyıcısı olanlar da kullanılmıştır. Taşıyıcı olan boğalar ile bunların yavruları bir çok ülkedeki Holstayn populasyonlarında damızlık olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Böylelikle BLAD, dünyadaki bir çok ülkeye yayılmıştır. Almanya, Danimarka, Hollanda, Belçika, Macaristan, İngiltere ve Japonya'da da homozigot BLAD vakalarına rastlanmıştır. Bunun dışında Kanada, Yeni Zelanda, Avustralya, Arjantin, Hindistan ve Rusya'da ise heterozigot bireylerin belirlendiği bildirilmiştir (Healy, 1992; Kostetskii ve ark., 1996; Nagahata ve ark., 1997).

Avrupa'da ki en yaygın A.B.D. orijinli Holstayn populasyonlarından birine sahip olan Macaristan'da BLAD problemi ilk olarak 1994'de bildirilmiştir. Bu ülkede kullanılan suni tohumlama boğalarının çoğu 1952 yılında A.B.D. de doğan Osborndale Ivanhoe isimli boğa ile akraba Carlin-M Ivanhoe Bell ve Penstate Ivanhoe Star isimli boğaların soyundan gelmektedir. Macaristan'da boğa adayı olarak seçilen genç erkek Holstaynların BLAD geni yönünden incelenmesi, bozukluğun ülkede ilk kez varlığının bildirildiği 1994 yılından sonra olmuştur (Fésüs ve ark., 1999).

BLAD eliminasyon programında, ülkede kullanılan sperma ve embriyoların da kontrol edilmesi gerekmektedir. BLAD'ın tanısında DNA kullanılarak yapılan

moleküler genetik testlerinin kullanılması, bu kalıtsal bozukluğun neden olacağı ekonomik kayıpların önlenmesinde çabuk ve etkili bir rol oynamaktadır (Fésüs ve ark., 1999).

Dünya süt siğırı yetiştiriciliğinde kullanılan damızlık ineklerin tohumlanmasıında donmuş sperma kullanılması oldukça yaygındır. Holstayn populasyonu da D128G allelinin yayılmasında ve frekansının artmasında suni tohumlamanın rolü büyütür. Suni tohumlama, BLAD gibi kalıtsal bozuklukların bir populasyonda hızla yayılmasından sorumlu olmakla birlikte letal olan resesif özelliklerin hızla eliminasyonunda da çok önemli bir araçtır. Suni tohumlamada kullanılan tüm boğaların D128G geni yönünden genotipleri belirlenerek, taşıyıcı boğalar gen havuzundan ayıklanabilir (Kehrli ve ark., 1992a).

A.B.D. de BLAD için kontrol programları; A) Taşıyıcıların belirlenmesi, B) Mevcut suni tohumlama boğalarının etiketlenmesi, C) Projeni test programlarındaki taşıyıcıların eliminasyonu olarak üç alanda yoğunlaşmıştır (Özbeyaz, 1997).

A.B.D. de Holstayn Yetiştiricileri Birliği, Holstayn boğaların test edilerek BLAD allelini taşıyan boğaların pedigrisine “BL”, taşımayanların pedigrisine ise “TL” kodunun eklenmesini kararlaştırmıştır (Powell ve ark., 1996). Buna göre, Kuzey Amerika’da suni tohumlama şirketleri tarafından aktif olarak kullanılan damızlık boğalar DNA testi ile inceledikten sonra, eğer boğa BLAD genini taşımıyorsa, boğa kataloguna isminden sonra “TL” kısaltması eklenir. Eğer incelenen boğa taşıyıcı ise boğa isminden sonra “BL” kısaltması eklenir (Gilbert ve ark., 1993). Bu sayede damızlık boğaların BLAD durumu hakkında yetiştirciler bilgilendirilmiş olur.

Türkiye’de Holstayn yetiştirciliği, 1958 yılında başlanmıştır. İlk olarak, bu tarihte A.B.D. den 30 dişi ve 17 erkek Holstayn dana getirilerek Karacabey Harasında Holstayn sürüsü oluşturulmuştur. Bu danalardan 11 boğa İstanbul, İzmir, Düzce ve Lalahan suni tohumlama istasyonlarına gönderilerek bu yörelerde halk elindeki hayvanların melezlemesine başlanmıştır. Daha sonraki yıllarda Almanya ve

Hollanda'dan yapılan ithaller bunu izlemiştir (Alpan, 1993). Sadece Holstayn sığır ırkında görülen bu genetik bozukluk hakkında henüz Türkiye'de yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Türkiye'ye son yıllarda A.B.D. den ve Avrupa ülkelerinden çok sayıda Holstayn düve ithal edilmiştir. Bu hayvanların, BLAD taşıyıcısı olup olamadıkları bilinmemektedir. Amerika'nın üstün verim özelliklerine sahip elit boğalarının Avrupa'da uzun yıllar kullanıldığı bilinmektedir. Bu kalıtsal bozukluk hakkında Türkiye'de gerek yetistariciler gerekse veteriner hekimler yeterince bilgi sahibi degillerdir. Bu durumda gerek veteriner hekimler gerekse yetistariciler tarafından tanınmayan bu kalıtsal bozukluktan ölümlerin olup olmadığı da bilinmemektedir. Bu nedenle ithal hayvanlarda bir yaşıdan küçük buzağıların ölümlerinde, veteriner hekimlerin bu hastalığa dikkat etmeleri gerekmektedir (Özbeyaz, 1997).

İlk olarak A.B.D.'de belirlenen ve sadece Holstayn sığırlarında görülen kalıtsal bir immun bozukluk olan BLAD süt endüstrisini tehdit eden en önemli kalıtsal hastalıktır (Kehrli ve ark., 1992a; Shuster ve ark., 1992). A.B.D.'de ki 19 milyar dolarlık süt endüstrisinde kullanılan sütçü ırk sığırlar arasında en önemli yeri Holstayn sığır ırkı tutar (Gerardi, 1996). Nagahata ve arkadaşları, BLAD taşıyıcısı boğaların Japon süt sığırı yetistariciliğinde yoğun olarak kullanıldığını bildirmiştirlerdir. Ayrıca ülke dışından ithal edilen bazı spermaların da BLAD taşıyıcısı olduğunu belirlemiştirlerdir. Bu nedenle BLAD'ın Japon süt endüstrisine ekonomik olarak önemli zararlar vereceğini öngörmüşlerdir (Nagahata ve ark., 1997).

Buzağı ölümü süt sığircılığında önemli bir ekonomik kayiptır. Süt sığircılığında doğan tüm buzağıların yaklaşık % 7,7'si çeşitli nedenlerden dolayı ölmektedir. İshal nedeniyle ölen sütçü ırklara ait buzağılarının % 36'sında belirli bir mikrobik ajan belirlenemez. Buna rağmen, genç Holstayn buzağılarında ölüm sebebi nadiren granülositopati sendromu (BLAD) olarak bildirilmektedir (Kehrli ve ark., 1990). Dolayısıyla BLAD'ın eliminasyonu için öncelikle taşıyıcı hayvanların belirlenerek sürüden ayılanması gerekmektedir

Hastalığın eliminasyonu için hastalığı tanımak şarttır (Özbeyaz, 1997). BLAD ilk olarak 1952 yılında A.B.D. de ortaya çıkmış ve buradan tüm Dünyaya yayılmıştır. Türkiye'de Holştayn yetiştirciliği ilk olarak 1958 yılında hem de A.B.D. den ithal edilen hayvanlarla başlanmıştır. Bu tarihten sonra değişik zamanlarda hem A.B.D. den hem de BLAD vakalarının bildirildiği Almanya ve Hollanda gibi ülkelerden bu kalıtsal bozukluğun varlığı bilinmeden canlı hayvan, embriyo ve sperma ithal edilmiştir. Dolayısıyla Türkiye'de bu kalıtsal bozukluğun bulunma olasılığı vardır.

Kalıtsal hastalıklar önemli ekonomik kayıplara neden olabilmektedir. Ekonomik kayıpların önlenmesinde en önemli unsur, hastalığa neden olan allelin belirlenerek bu alleli taşıyan bireyin yetiştirmeden çıkarılmasıdır. Bu çalışmada incelenen kalıtsal bozukluk olan BLAD süt sıgircılığında en fazla ekonomik kayba neden olan kalıtsal hastaliktır. Tezin amacı Türkiye'de yetiştirilen Holştayn, İsviçre Esmeri, Yerli Kara, Güney Anadolu Kırmızısı, Doğu Güney Anadolu Kırmızısı ve Boz Irk sığır ırklarından kan örnekleri alınarak Fenol-Kloroform yöntemi ile DNA izolasyonun yapmak ve elde edilen örneklerde ait DNA'larda PCR-RFLP yöntemiyle BLAD allelinin bulunup bulunmadığının araştırılmakdır.

Ulaşılan sonuç ile Türkiye'deki Holştayn yetiştirciliğinde damızlık olarak seçilecek buzağılarda BLAD taramasının rutin kullanılmasını önermek ve Holştaynlar'daki diğer kalıtsal kusurların ve farklı türlerdeki kalıtsal kusurların belirlenmesinde araştırcılara yeni bir bakış açısı sunmakta hedefler arasındadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali

Çalışma Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik A.B.D. Moleküler Genetik Laboratuvarında yapılmıştır. Çalışma materyali çizelge-1'de ayrıntılı olarak verilmiştir. Çalışmanın materyalini, Damızlık Sığır Yetiştiriciler Merkez Birliği (DSYMB) ile Tarım Bakanlığının birlikte yürüttüğü projeni test kapsamında kullanılan Holştayn ırkı boğalar, boğa adayı olarak seçilen Holştayn buzağılar ve danalar oluşturmuştur. Kan örnekleri İzmir-Menemen Suni Tohumlama İstasyonu ve Manisa-Beydere Tohum ve Sertifikasyon Test Müdürlüğü ve DSYM Birliğine üye Aydın, Balıkesir, Burdur, Bursa, Edirne, İzmir, Kırklareli, Konya, Muğla, Sakarya ve Samsun'da ki yetiştiriciler tarafından üretilen ve birlik tarafından boğa adayı olarak seçilmek üzere belirlenen erkek buzağılardan alınmıştır. Ayrıca Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim Araştırma ve Uygulama Çiftliğinde suni tohumlama için elde edilen iki baş Holştayn boğa, Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsünde ki boğa adayları ve bu iki kurumda mastitis tedavisi gören iki Holştayn inek çalışmada kullanılmıştır.

Holştayn ırkından başka Yerli sığır ırklarından Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK) (Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü Gezköy/Erzurum), Boz İrk (Marmara Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Bandırma/Balıkesir), Güney Anadolu Kırmızısı (GAK) (Çukurova Tarımsal Araştırma Enstitüsü Karataş/Adana, Hatay/Antakya ve Reyhanlı, Kilis), Yerli Kara (Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Lalahan/Ankara), İsviçre Esmeri (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim Araştırma ve Uygulama Çiftliğindeki) sığırlardan kan alınmıştır. Kan örneği alınan yerli sığır ırkları ve İsviçre Esmerlerinin hepsi sağılan ergin dişi materyaldir.

Çizelge 1: Çalışmada kullanılan ırklar, kullanılan örneklerin sayısı ve örneklerin alındığı yerler.

| Irk | Hayvan Sayısı | Örneğin alındığı yer |
|--|--------------------------|---|
| Holştayn | 120 Baş (118 ♂ + 2 ♀) | İzmir/Menemen Manisa/Beydere, Aydın, Balıkesir, Burdur, Bursa, Edirne, İzmir, Kırklareli, Konya, Muğla, Sakarya, Samsun Ankara Üni. Vet. Fak. Eğitim Araştırma ve Uygulama Çiftliği Kazan/Ankara, Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Lalahan/Ankara |
| İsviçre Esmeri | 20 Baş (Hepsi ♀) | Ankara Üni. Vet. Fak. Eğitim Araştırma ve Uygulama Çiftliği Kazan/Ankara |
| Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK) | 20 Baş (Hepsi ♀) | Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enst. Gezköy/Erzurum |
| Güney Anadolu Kırmızısı (GAK)-Kilis | 20 Baş (Hepsi ♀) | Çukurova Tarımsal Araştırma Enstitüsü Karataş/Adana, Antakya ve Reyhanlı/Hatay, Kilis |
| Boz İrk | 20 Baş (Hepsi ♀) | Marmara Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Bandırma/Balıkesir |
| Yerli Kara | 20 Baş (Hepsi ♀) | Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Lalahan/Ankara |
| TOPLAM | 220 Baş | |

2.2. Kan Alımı

Kan, 10 ml'lik EDTA'lı vakumlu tüplere, steril ve tek kullanımlık iğne ile vena jugularis'e girilerek steril olarak alınmıştır. Her hayvandan ikişer tüp kan alınarak soğuk zincirde laboratuara getirilmiştir. Alınan kanların hemoliz olmasını önlemek için kanların alındığı EDTA'lı tüpler arada alt üst ederek karıştırılmıştır. Laboratuara getirilen kanlar hemen 3000 devirde 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda, steril ve tek kullanımlık plastik pastör pipetleri kullanılarak tüpün orta kısmında toplanmış olan lökosit tabakası alınmış ve 1,5 ml'lik etiketli steril tüplere konulmuştur. Daha sonra içinde lökosit bulunan bu tüpler -20 °C de DNA izolasyonuna kadar saklanmıştır.

2.3. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu;

- İlk olarak, steril 1,5 ml'lik ependorf tüplerine 100 μ l lökosit konulmuştur.
- Ayrılan lökosit üzerine 300 μ l 1 X TNE solüsyonu, 30 μ l Tris-HCl (pH 8), 5 μ l proteinaz K (10 mg/ml), 10 μ l % 20'lik SDS solüsyonu eklenerek, karışım vorteksle iyice karıştırılmıştır.
- Karışım, bir gece 50 °C'lik etüvde bekletilmiştir.
- Ertesi gün etüvden çıkarılan örneklerin üzerine 445 μ l fenol eklenerek 10 dakika hafifçe sallanarak karıştırılıp 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonunda üstteki sıvı kısmı yeni bir steril ependorf tüpüne konulmuş ve üzerine fenol-kloroform (1/1) karışımından 445 μ l eklenmiştir. Karışım, tekrar 10 dakika alt üst edilerek karıştırılmıştır. Sürenin sonunda tüpler 10 dakika 3000 devirde santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonunda yine üstteki sıvı kısmı ile dikkatlice, alttaki kısmı karışmayacak şekilde alınarak başka bir etiketli steril ependorf tüpüne konulmuştur. Alınan bu sıvının üzerine 445 μ l kloroform-izoamil alkol (24/1) ilave edilip tekrar 10 dakika karıştırılmıştır. Sonra, 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonunda yine alttaki kısmı karışmayacak şekilde, üstteki sıvı kısmı dikkatlice alınıp başka bir steril ependorf tüpüne konulup üzerine -20 °C de saklanan saf etil alkolden 890 μ l eklenmiştir.
- Soğuk etil alkol eklendikten sonra ependorf tüpü DNA iplikçikleri kümeleşinceye kadar 4-5 kez hafifçe aşağı yukarı hareket ettirilmiştir.
- Kümeleşen DNA iplikçiklerinin tüpün dibine çökmesi için tüp 10 dakika 10000 devirde santrifüj yapılmıştır.
- Santrifüj sonunda üstteki alkol uzaklaştırılarak tüpün dibine çökmüş olan DNA peletinin üzerine bu sefer %70'lik etil alkolden 890 μ l eklenmiştir.
- Tekrar 10 dakika 10000 devirde santrifüj yapılmıştır.
- Santrifüj sonunda yine tüpün üstündeki alkol dökülmüştür.
- Tüp içindeki alkolin tamamen uzaklaşması için tüp laminar flow'da kurumaya bırakılmıştır.

- Tamamen kuruyan ve içinde DNA bulunan tüpün üzerine $100 \mu\text{l}$ TE buffer (10 mM Tris, 1mM EDTA pH 8,0) konularak tüp içerisindeki DNA peletinin çözülmesi için bir gece buzdolabında bekletilmiştir.
- Ertesi gün DNA izolasyon işleminin başarılı olup olmadığını kontrol için örneklerden $2 \mu\text{l}$ alınarak % 1'lik agaroz jelde 15 dakika elektroforez yapılmıştır. Elektroforez sonunda, eğer DNA izolasyonu başarılı ise jel ultra-viyole ışık veren görüntüleme sehpasında örneklerin yüklediği kuyucuklarda fluoresan parıldama gözlenmiştir. Daha sonra DNA elde edilen örnekler Polimeraz Zincir Reaksiyonunda (PCR) kullanılmak için -20°C de saklanmıştır.

DNA izolasyonu için kullanılan solüsyonlar ve hazırlanmış formülleri;

1 X TNE (Toplam 30 ml)

1,5 ml Tris-HCl pH 8

3 ml 1 M NaCl

300 μl 0,5 M EDTA pH 8

25,2 ml bidistile su

Tris-HCl pH 8 (1L)

12,1 g Tris

800 ml distile su

pH, HCl ile ayarlandıktan sonra distile su ile 1 litreye tamamlanır.

2.4. Kullanılan Primerler ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonunda primer olarak Bernd Kriegesmann ve arkadaşları (1997), tarafından bildirilen primerler kullanılmıştır. Primerler; forward, 5'- CCT GCA TCA TAT CCA CCA G-3' ve reverse, 5'- GTT TCA GGG GAA GAT GGA G-3' şeklinde 19 bazdan oluşan iki primerdir. Primerler liofilize olarak satın alınmıştır. Bu primerler kullanılarak yapılan PCR sonunda 343 bp uzunluğunda tek bir PCR ürünü elde edilmiştir.

PCR karışımı Bernd Kriegesmann ve arkadaşlarının (1997) literatürde bildirdikleri baz alınarak laboratuvara optimize edilmiştir. Buna göre, genomik DNA hariç her bir örnek için PCR karışımı $47 \mu\text{l}$ olarak hesaplanmıştır. PCR karışımı, karışım hazırlanırken geçen sürede kullanılan reaktiflerin kimyasal özelliklerinde bir değişme olmasını önlemek için buz üzerinde hazırlanmıştır. Genomik DNA dışındaki tüm reaktiflerin içinde bulunduğu PCR karışımı, bir seferde incelenen örnek sayısı ile orantılı olacak şekilde steril bir $0,5 \text{ ml}'lik$ ependorf tüpü içinde hazırlanmıştır. Bu karışımından her bir örnek için $47 \mu\text{l}$ alınarak daha önce etiketlenerek buz üzerine yerleştirilen $0,2 \text{ ml}'lik$ ependorf tüplerine dağıtılmıştır.

Hazırlanan PCR stok karışımı $0,2 \text{ ml}'lik$ ependorf tüplerine dağıtıldıktan sonra incelenen örneklerde ait genomik DNA'dan $3 \mu\text{l}$ alınarak bu karışımın üzerine eklenmiştir. Her bir örnek için hazırlanan PCR karışımı otomatik pipetle ayrı ayrı 2-3 kez pipete edilerek karıştırılmıştır. Daha sonra ependorf tüplerinin kenarlarına yapışmış olan kısmı dibe çöktürmek için kısa bir santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonunda içinde örneklerin bulunduğu tüpler daha önce 94°C 'ye kadar ısıtılan üstten ısıtmalı Biometra® T1 Thermocycler marka ısı düzenleme aletine yerleştirilmiştir. Kullanılan ısı düzenleme aleti 99 örnek kapasitelidir.

PCR de kullanılan reaktifler ve miktarları;

| | | |
|--|--|---------------------|
| - | dNTP karışımı | $0,25 \mu\text{l}$ |
| (stok olarak alınan dATP, dTTP, dGTP, dCTP den hazırlanan karışım) | | |
| - | Primer Forward | $1 \mu\text{l}$ |
| | Reverse | $1 \mu\text{l}$ |
| - | 1 U Taq polimeraz enzimi (5 U stoktan) | $0,4 \mu\text{l}$ |
| - | 10 x PCR Bafır | $5 \mu\text{l}$ |
| - | MgCl_2 | $5 \mu\text{l}$ |
| - | Bidistile su | $34,35 \mu\text{l}$ |
| TOPLAM | | $47 \mu\text{l}$ |

Bu PCR karışımının üzerine; 100 ng/ml oranındaki örnek genomik DNA'sından 3 μ l ilave edilerek her örnek için toplam 50 μ l'lik PCR karışımı hazırlanmıştır.

PCR işleminde, 120 baş damızlık ve damızlık adayı Holştayn boğa ile Holştayn inek, 20 baş Doğu Anadolu Kırmızısı, 20 baş Güney Anadolu Kırmızısı, 20 baş Yerli Kara, 20 baş Boz Irk, 20 baş İsviçre Esmerinden alınan kanlardan elde edilen DNA'lar, Bernd Kriegesmann tarafından gönderilen BLAD +, BLAD - ve BLAD taşıyıcı hayvanlara ait standart DNA'lar kullanılmıştır. Böylece toplam 223 PCR uygulaması yapılmıştır.

Çalışma kolaylığı nedeniyle PCR işlemi her seferinde 20 örnekle yapılmıştır. Buz üzerinde hazırlanan PCR karışımı, 94 °C'ye kadar ısıtılan ısı düzenleme aletine yerleştirilmiştir. Kapak kapatıldıktan sonra PCR işlemi başlatılmıştır.

PCR işleminde, hazırlanan ve 0,2 ml'lik ependorflara dağıtılan PCR karışımı önce 95 °C de 5 dakika tutulmuştur. Bu süre sonunda her bir döngüsü;

| | |
|-------|-----------|
| 94 °C | 1 dakika |
| 57 °C | 1 dakika |
| 72 °C | 1 dakika, |

şeklindeki üç farklı ısı derecesinde birer dakika tutulacak şekilde 33 döngü yapılmıştır. Son döngüden sonra örnekler, 72 °C de 5 dakika tutularak PCR işlemi tamamlanmıştır. Isı düzenleme aletinden çıkarılan PCR ürünleri kısa bir süre santrifüj yapılmıştır. Daha sonra, doğrudan elektroforez uygulanarak PCR'nin başarılı olup olmadığı kontrol edilmiştir. PCR'nin başarılı olduğu PCR ürünleri restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesme işleminde kullanılmak üzere 4 °C de saklanmıştır.

2.5. Elektroforez

Elektroforez çözeltisi olarak Tris-Borat-EDTA (TBE) kullanılmıştır. Elektroforez çözeltisi önce 5 X yoğunlukta stok solüsyon olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bu stok solüsyonu 1 X seyreltilerek kullanılmıştır. Stok solüsyon hazırlanırken 54 gr Tris base; 27,5 gr Borik asit; 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) 1 litre distile suda çözdürülerek koyu renkli şişelerde oda ısısında saklanmıştır. Kullanılacağı zaman alınan bir ölçek stok solüsyonu, distile su ile beş katı sulandırılarak kullanma solüsyonu hazırlanmıştır. Bu kullanma solüsyonu hem jelin hazırlanmasında hem de elektrolit çözeltisi olarak kullanılmıştır. Jelin hazırlanması için 25 ml, elektrolit çözeltisi olarak da 300 ml 1 X TBE kullanma çözeltisi kullanılmıştır. Elektroforez tankında bulunan elektrolit solüsyon başlangıçta her elektroforezde yenilenmiştir. Daha sonra 7-8 elektroforez denemesinden sonra değiştirilmiştir. Bu denemeler sırasında elektroforezin kalitesi açısından herhangi bir fark belirlenmemiştir. Ancak elektroforez işlemi sırasında elektrolit çözeltisinde köpürme ve bantların görüntü kalitesinde düşme olduğunda çözelti değiştirilmiştir. Belirtilen problemler ortaya çıkmadığı sürece tank içindeki elektrolit solüsyonu, hem ekonomik olması hem de fazla zaman kaybının önlenmesi bakımından 8 deneme bir yenilenmiştir.

2.5.1. Jel'in Hazırlanması

Çalışmada, jelin hazırlanmasında PRONA® Basica le agaroz kullanılmıştır. Jel % 2 yoğunlukta hazırlanmıştır. Bu amaçla 0,5 gr agaroz tارتılarak 250 ml'lik erlenmayere konulmuştur. Tارتılan bu agarozun üzerine 25 ml 1 X TBE ile çözeltisi eklenmiştir. Hazırlanan jelin homojen bir karışım olması için 45°lik açı ile sürekli hafifçe sallanarak agaroz tamamen saydamlaşincaya kadar ateş üzerinde tutulmuştur. Daha sonra, şeffaflaşan jel üzerine 0,5 μ l/ml oranında etidyum bromid katılmıştır. Ethidium bromide'in jel içine homojen dağılmasını sağlamak amacıyla karışım hafifçe sallanarak karıştırılmıştır. Bu işlemin sonunda erlenmayer akan musluk altında tutularak, el yakmayacak kadar soğutulmuştur.

2.5.2. Jel'in Dökülmesi

Çalışmada, elektrotları arasındaki uzaklık 15 cm olan Biometra® Agagel Mini marka elektroforez tankı kullanılmıştır. Jel, boyutları 9 x 6,5 x 1,5 cm ve ultra-viyole ışık geçiren jel teknesine dökülmüştür. Örnekler ait DNA'lar kullanılarak yapılan PCR sonunda elde edilmesi hedeflenen 343 bp'lik tek bandın varlığının belirlenmesi amacıyla yapılan ilk elektroforezde 13 dişli jel tarağı kullanılmıştır. İlk elektroforez sonunda 343 bp'lik bandın görüldüğü PCR ürünleri belirlenerek restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Elde edilen ürünlerde BLAD -, BLAD taşıyıcı ve varsa hasta bireylerin belirlenmesi amacıyla yapılan ikinci elektroforez, sekizi örneklerin biri DNA merdivenin yüklenmesi için olmak üzere toplam dokuz kuyulu tarak kullanılmıştır. Jel tekneye, hava kabarcığı olmayacak şekilde döküldükten sonra jel tarağı jelle yerleştirilmiş ve jelin katılmasına beklenmiştir. Eğer jelde hava kabarcığı kalmışsa, kullanılmamış steril bir pipet ucu yardımı ile bu hava kabarcığı jelin taraktan en uzak tarafına doğru çekilerek örneklerin yükleneceği kuyulardan uzaklaştırılmıştır. Tekneye döküldüğünde şeffaf olan jel, opak bir görünüm alındığında jelin katılacağı anlaşıılır. Tarak katılan, jeli yırtmadan dikkatlice çıkarılmış ve jel, elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Jel tanka yerleştirildikten sonra tanka, jelin üstünü tamamen örtecek kadar elektrolit çözeltisi eklenmiştir.

2.5.3. Kuyulara Örneklerin yüklenmesi

PCR sonunda elde edilen ürünler kuyulara yüklenirken önce 1 cm eninde, 2,5 cm uzunluğunda parafilm kesilmiş ve parafilm üzerine, kuyulara yüklenecek örnek sayısı kadar yükleme çözeltisi (loading buffer), her örnek için 2'şer μ l olacak şekilde otomatik pipetle konulmuştur. Parafilm üzerine konan 2 μ l yükleme çözeltisinin üzerine örnekler ait PCR ürünlerinden 5 μ l eklenerek otomatik pipetle karıştırılarak, kuyulara yüklenmiştir. En son kuyuya da PCR ürünlerinden elde edilecek bantların belirlenmesi için 100 bp'lik (MBI Fermentas® SMO241) standart DNA merdiveni (DNA Ladder) yüklenerek elektroforez işlemi başlatılmıştır. Elektroforez, 45 dakika

80 volt elektrik gerilimi uygulanarak yapılmıştır. Jeldeki örneklerin ilerleyişleri izlenerek sürenin sonunda elektroforez bitirilmiş ve tanktaki jel, teknesi ile birlikte tanktan çıkarılarak ultra-viyole ışık veren jel görüntüleme sehpasında incelenmiştir.

2.6. Bantların Gözlenmesi ve Fotoğraf Çekimi

Etidyum bromide ile boyanan DNA molekülü ultra-viyole (UV) ışıkta, floresan yansımıma gösterir. Bu yansımamanın görülmESİ, PCR sonunda aranan bantların varlığına işaretettir. Bunun için elektroforez sonunda jel teknesi üzerindeki jel ile birlikte tanktan alınarak jel görüntüleme sehpasına konulmuştur. Sehpanın ultra-viyole (UV) ışığı açılarak, önce aranan 343 bp uzunluğundaki tek band jelde görülmüş ve sonra bantların bulunduğu jelin fotoğrafı çekilmiştir. Fotoğraf Polaroid® (DS-34) fotoğraf makinesi ile çekilmiştir. Çiplak gözle pembe floresan renk veren bantlar, yeşil lens kullanılarak çekilen polaroid fotoğrafta siyah-beyaz olarak görüntülenmiştir. Elde edilen PCR ürünlerinin elektroforezi sonunda PCR'ın başarılı olduğu örneklerden 343 bp'lik tek bir bant elde edilmiştir. Bu tek bantın elde edildiği örneklerde ait PCR ürün stokları daha sonra *Taq I* restriksiyon enzimi ile kesilerek, incelenen örneklerin BLAD durumlarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

2.7. *Taq I* Restriksiyon Enzimi ile PCR Ürünlerinin Kesilmesi

Elektroforez sonunda 343 bp'lik bantların elde edildiği örneklerde ait PCR ürünleri *Taq I* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Çalışmada, Fermentas® firmasının 10 ünite/ μ l konsantrasyonundaki 3000 ünitelik *Taq I* ER0671 katalog numaralı restriksiyon enzimi kullanılmıştır.

Bu enzim DNA'yı

5'....T \downarrow C G A.....3',

3'....A G C \downarrow T.....5' bölgelerinden kesmektedir.

Taq I restriksiyon enzim kesimi her bir örnek için;

| | |
|--------------|------------------------------|
| <i>Taq I</i> | 0,5 μ l |
| 10 x Buffer | 3 μ l |
| Bidistile su | 16,5 μ l kullanılmıştır. |

Restriksiyon enzim ile kesim işlemi, bir örnek için toplam hacmi 20 μ l olacak şekilde hazırlanan karışım üzerine, 343 bp'lik bantların görüldüğü PCR ürününden 10 μ l eklenerek yapılmıştır. Restriksiyon enzimi ile kesme işlemi de her seferinde 20 örnek işlenecek şekilde bir buz üzerinde yapılmıştır. Bu amaçla etiketlenmiş olan 0,2 ml'lik ependorf tüpleri buz üzerine yerleştirilmiştir. Her bir örnek için gerekli olan restriksiyon karışımı buz üzerindeki ependorfların birinde hazırlanıp diğer etiketli ependorflara 20'ser μ l dağıtılmıştır. Hazırlanan tüpler Biometra® T1 Thermocyclers marka ısı düzenlemeye aletine yerleştirilmiştir.

İşı düzenlemeye aletine yerleştirilen örnekler, 65 °C'de 2 saat tutulmuş ve sürenin sonunda restriksiyon enzimini inaktive etmek amacıyla örnekler yine ısı düzenlemeye aletine 80 °C'de 30 dakika tutularak işleme son verilmiştir.

İşlemin sonunda örneklerde tekrar yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan jelde elektroforez yapılmıştır. Bu son elektroforezde, homozigot normal bireylerde 191 bp ve 151 bp'lik iki bant, homozigot hasta bireylerde 343 bp'lik tek bant, taşıyıcılarda ise 191 bp, 151 bp ve 343 bp olmak üzere üç bandın görülmesi amaçlanmıştır. Elektroforez sonunda PCR ürünlerinin yürütüldüğü jelin fotoğraflarının çekildiği gibi fotoğraf çekilerek sonuçlar kayıt edilmiştir.

Yapılan PCR ve restriksiyon enzimi ile kesim işlemleri, her örnek için ikişer kez tekrarlanmıştır. BLAD yönünden taşıyıcı olarak belirlenen hayvanlarda ise işlemler DNA izolasyonundan itibaren tümüyle tekrarlanmıştır. Tekrarlarda her seferinde aynı bulgular elde edilmiştir.

3. BULGULAR

Uygulanan fenol-kloroform DNA izolasyon protokolü ile 120 baş Holştayn boğa, boğa adayı ve Holştayn inek, 20 baş İsviçre Esmeri, 20 baş Doğu Anadolu Kırmızısı, 20 baş Güney Anadolu Kırmızısı, 20 baş Yerli Kara, 20 baş Boz Irk'a ait toplam 220 baş sığirdan alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen DNA'lar büyük moleküllü genomik DNA olması nedeniyle % 1'lük agaroz jelde elektroforez yapılmıştır. Yapılan 15 dakika elektroforez sonunda jelde'ki etidyum bromid ile birleşen DNA'ların floresan parıldama vermesi ile DNA izolasyonunun başarısı doğrulanmıştır. İzole edilen DNA'ların % 1'lük agaroz jel elektroforezi sonunda jeldeki parıldamalarının çekilen polaroid fotoğrafı Şekil 1.de görülmektedir.



Şekil 1: Fenol-Kloroform yöntemi ile elde edilen örnekler ait genomik DNA'ların % 1'lük agaroz jelde ki görüntümleri. Laboratuarda verilen örnek numaralarına göre jele yüklenen örnekler, soldan-sağ: Güney Anadolu Kırmızısı 11, Boz Irk 18, İsviçre Esmeri 1, Yerli Kara 5, Doğu Anadolu Kırmızısı 805, Lalahan 1, Menemen 14, Beydere 5, Lalahan ♀.

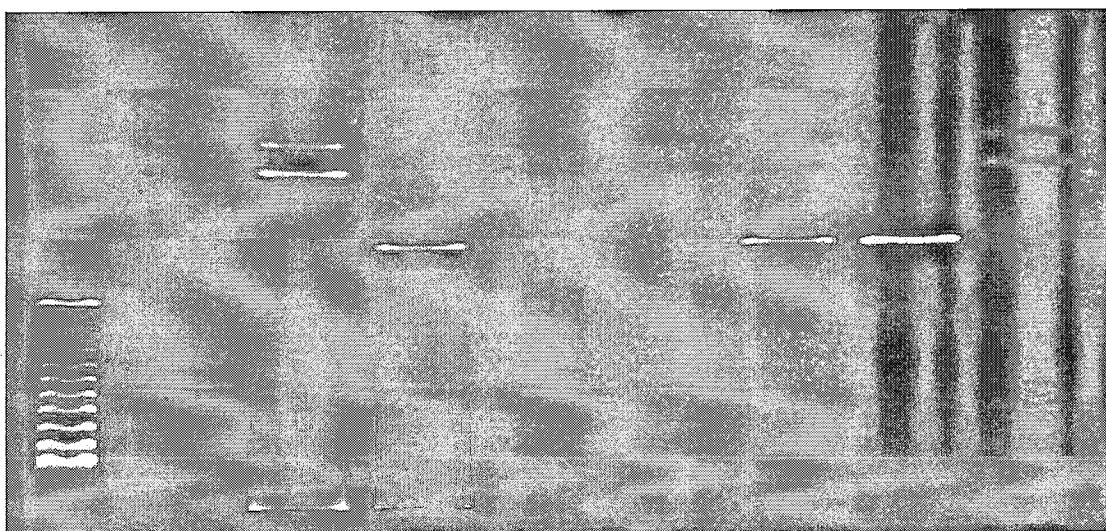
Örnekler ait kanlardan elde edilen DNA'lar ile PCR işlemi yapılmıştır. PCR sonunda elde edilen ürünlerin % 2'lük agaroz jel elektroforezlerinde 343 bp'lik tek bandın görülmesi ile PCR'nin başarısı doğrulanmıştır. Elde edilen 343 bp'lik bantlar elektroforez sonunda, jelin ultraviyole ışık veren jel görüntüleme sehpası üzerine konulduğunda çıplak gözle kolaylıkla saptanmıştır. Daha sonra PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezlerinin fotoğrafları çekilmiştir.

PCR sonunda elde edilen ürünlerinin büyülüklüğü 343 bp uzunluğundadır. Bu büyülükteki PCR ürünlerini en iyi görüntüyü % 2'lik agaroz jelde verdiği için PCR ürünlerini % 2'lik agaroz jelde elektroforez yapılmıştır. Yapılan elektroforez sonucunda kullanılan örneklerde ait 343 bp'lik bantlar Şekil 2.'de görülmektedir.



Şekil 2: Fenol-Kloroform yöntemi ile elde edilen örneklerde ait DNA'lar kullanılarak yapılan PCR sonunda elde edilen ürünlerin % 2'lik agaroz jel elektroforez görüntüleri. Soldan-sağ'a jele yüklenen örnekler, 100 bp'lik DNA Merdiveni, Güney Anadolu Kırmızısı 11, Boz İrk 18, İsviçre Esmeri 1, Yerli Kara 5, Doğu Anadolu Kırmızısı 805, Lalahan 1, Menemen 14, Beydere 5, Lalahan ♀.

PCR sonunda 343 bp'lik bantların elde edildiği örneklerde ait PCR ürünlerini, *Taq I* endonükleaz restriksiyon enzimi ile kesilerek % 2'lik agaroz jelde elektroforez uygulandığında Şekil 3.de ki görüntü elde edilmiştir.



Şekil 3; *Taq* I Endonükleaz enzimi ile kesilen PCR ürünlerinin % 2'lük agaroz jel elektroforezi sonucu BLAD açısından genetik yapılarının belirlenmesi: Soldan, sağa örneklerin sıralanması, 100 bp'lik DNA Merdiveni, Doğu Anadolu Kırmızısı 805, İsviçre Esmeri 6, Menemen 12 (BLAD +/-), Menemen 14, Beydere 5, BLAD +/- (kontrol), BLAD +/+ (kontrol), BLAD -/- (kontrol),

İncelenen 120 baş Holstayn boğa, boğa adayı ve Holstayn dışı sığır ile 20 baş İsviçre esmeri, 20 baş Güney Anadolu Kırmızı, 20 baş Yerli Kara, 20 baş Boz Irk, 20 baş Doğu Anadolu Kırmızısından fenol-kloroform yöntemi ile DNA izole edilmiştir. Elde edilen DNA'lar ile yapılan PCR işlemi sonunda tüm örneklerden 343 bp'lik bant elde edilmiştir. Elde edilen PCR ürünlerinin *Taq* I restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucunda incelenen örneklerden iki Holstayn sığırın BLAD taşıyıcısı olduğu belirlenmiştir. BLAD taşıyıcısı olan bu örneklerden biri, Damızlık Sığır Yetiştiricileri Merkez Birliğinin yetiştirdiği ve Menemen'de ki suni tohumlama istasyonunda sperma sağlanan ve bu çalışmada "Menemen 12" olarak kodlanan "TR1008632" kulak numaralı, babası Almanya doğumlu, annesi Türkiye'de yetiştirilen "Vedat" isimli damızlık boğadır. Diğer ise Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsünden kan örneği alınmış olan ve çalışmada Lalahan ♀ olarak kodlanan 95-99 kulak numaralı Holstayn ineğidir. Diğer örneklerin tamamı homozigot BLAD -/- olarak tanımlanmıştır. İncelenen örneklerde homozigot BLAD +/+ bireylere rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, Türkiyede yetiştirilen 120 baş Holstayn ırkı sığırda BLAD geninin frekansı 0,0084 olarak bulunmuştur.

4. TARTIŞMA

Çeşitli ülkelerde, yayınlanan makale, rapor ve istatistiklere dayanılarak Dünya Holstayn populasyonunda BLAD'ın yaygınlığı hakkında kesin karar verebilmek mümkün değildir. Bununla birlikte, Holstayn sürülerinde BLAD taşıyıcılarının belirlenmesi ve taşıyıcıların elimine edilmesi için etkili kontrol programlarına ihtiyaç vardır. Çünkü, suni tohumlama için sperma üreten firmaların listelerinde BLAD bakımından taşıyıcı olan boğalar bulunmaktadır (Nagahata ve ark., 1997). Dolayısıyla BLAD'ın eradike edilmesinde öncelikle, taşıçı boğaların yetişirmeden çıkarılmasını sağlayacak, etkili bir tanı metodu kullanılmalıdır.

Çalışmada DNA izolasyonu için kullanılan “fenol-kloroform” yöntemi ile alınan numunelerden kolay ve kısa sürede DNA izolasyonu yapılmıştır. Ayrıca bu yöntem ile daha az miktarda kimyasal madde kullanılmıştır. Ancak, yöntemin her aşamasında 1,5 ml'lik yeni, etiketli ependorf tüplerinin kullanılması fazla zaman ve işçiliği gerektirmektedir. Bu durum yönteminin tek olumsuz yönü olarak görülmüştür. Yöntemin kolay uygulanabilirliği, ucuzluğu ve kısa süresi avantajlı yönleridir.

BLAD'a neden olan, CD18 genindeki mutasyon ilk olarak Kehrli ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Shuster ve arkadaşları da 1992 yılında BLAD'a neden olan mutant D128G allelini belirlemek amacıyla bir PCR-RFLP testi geliştirmiştirlerdir. O tarihten beri Holstaynlarda BLAD allelinin varlığının belirlenmesinde bu test ve daha sonra geliştirilen diğer moleküller genetik tanı teknikleri rutin olarak kullanılmaktadır (Shuster ve ark., 1992; Arrayet ve ark., 2002).

Shuster ve arkadaşlarının geliştirdikleri bu protokolde teknik olarak iki önemli problem göze çarpmaktadır; birincisi kullanılan primerlerle yapılan PCR işlemi sonunda, genomik DNA'dan 58 bp uzunluğunda bir bölge çoğaltırlar. Elde edilen 58

bp uzunluğundaki PCR ürünün *Hae* III ve *Taq* I restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucunda küçük RFLP ürünü elde edilir. Elde edilen küçük RFLP ürünler agaroz jel elektroforezi sırasında hızla jеле diffuze oldukları için gözle belirlemek zordur. Bu durum ise şüpheli örnekte BLAD allelinin varlığının veya yokluğunun araştırıcı tarafından belirlenmesini güçlendirmektedir. İkinci olarak metotta, biri 30 diğeri, 19 bazdan oluşan iki primer kullanılmaktadır. Farklı baz uzunluklarındaki iki primerin annealing (uzama) ısları dengeli değildir. Sonuç olarak mevcut iki problem kritik örneklerde veya önemli materyallerde testin güvenilirliğini düşürür. Ayrıca yöntem, elde edilen küçük bantların görülebilmesi için NuSieve agaroz kullanmasını gerektirir. NuSieve agaroz, normal agarozdan daha pahalıdır. Shuster ve arkadaşlarının geliştirdikleri yöntem NuSieve agarozdan % 4 gibi yüksek konsantrasyonda kullanmayı gerektirir. bu problemler nedeniyle Shuster ve arkadaşlarının önerdikleri PCR-RFLP yöntemi tercih edilmemiştir.

Batt ve arkadaşlarının önerdiği PCR-LCR test yöntemi, PCR-RFLP de kullanılan iki primer yerine 6 tane işaretli oligonukleotid kullanmayı gerektirmesi, daha fazla yatırım gerektirmesi, yeteri kadar etkili olmaması ve pahalı olması nedeniyle tercih edilmemiştir.

Tajima ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem, araştırmacıların yöntemin kesin olarak BLAD tanısında kullanılabilirliğini bildirmemesi ve yöntemin detayları hakkında yeterince bilgi elde edilemediği için çalışmada tercih edilmemiştir.

Mirck ve arkadaşlarının 1995 yılında geliştirdikleri yöntem ise elde edilen PCR ürünün *Taq* I endonükleaz enzimi ile kesilmesini takiben yapılan % 4'lük NuSieve agaroz jel elektroforezinde, elde edilen bantların küçük olması, 21 bazlık nisbeten uzun iki primerin kullanılması ve pahalı NuSieve agarozun % 4 gibi yüksek konsantrasyonda kullanmayı gerektirmesi nedeniyle çalışmada tercih edilmemiştir.

Kriegesman ve arkadaşlarının 1997 yılında geliştirdikleri ve bu çalışmada da kullanılan PCR-RFLP yönteminde, 19 bp'lik iki primer ile yapılan PCR ile 343

bp'lik tek bir bant elde edilmektedir. Elde edilen 343 bp büyükligündeki PCR ürünün *Taq I* endonükleaz enzimi ile kesilmesinden sonra yapılan % 2'lik agaroz jel elektroforezi sonunda, homozigot BLAD vakalarında 343 bp'lik tek bir bant, homozigot normallerde 191 ve 151 bp'lik iki bant, taşıyıcılarda ise 343, 191 ve 151 bp'lik üç bant gözlenmektedir. Ayrıca Kriegesman ve arkadaşlarının önerdiği protokolde, incelenen örneklerin BLAD durumlarını belirlemek için % 2'lik normal agaroz jel elektroforezi yeterlidir. Yapılan % 2'lik agaroz jel elektroforez sonunda herhangi bir tereddüde yer bırakmaksızın tüm bantlar rahatlıkla görülecek tanı yapılmıştır.

Kriegesman ve arkadaşlarının önerdiği protokol, kolay uygulanabilir olması, ekonomik olarak uygunluğu, tanının kolay ve kesin yapılabılır olması açısından avantajlıdır. Mevcut avantajlarının yanı sıra, protokolü öneren araştırcıya kolay ulaşılarak konu hakkında gerekli bilimsel yardım alınmıştır. Yukarıda belirtilen avantajlar nedeniyle, Türkiye de ki Holstbayn sığırlarında kalitsal BLAD bozukluğuna neden olan mutant allelein varlığının araştırılması için yapılan bu çalışmada Kriegesman'ın önerdiği protokol kullanılmıştır.

Yapılan çalışma ile Türkiye'de yetiştirilen yerli sığır ırklarında ve İsviçre Esmeri sığır ırkında kalitsal BLAD bozukluğuna neden olan mutant allelein bulunmadığı belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuç, bozukluğun sadece Holstbayn ırkında görüldüğünü bildiren çalışmalarla paralellik gösterir (Agerholm ve ark., 1993; Jánosa ve ark., 1999; Muraleedharan ve ark., 1999). Ancak Türkiye'de kontrollü çiftleştmeler ve melezlemeler olmadığı için Hoštayn melezi hayvanlarda mutant D128G alleleinin var olabileceği beklenilebilir.

Shuster ve arkadaşlarının BLAD tanısı için PCR-RFLP testini geliştirmelerinden sonra, A.B.D. de Holstbayn sığırlarından alınan sperma, kan ve süt örnekleri test edilmiştir. Örneklerden elde edilen DNA'ların test edilmesi sonucunda A.B.D.'de ki en iyi verim özelliklerine sahip suni tohumlama boğalarının yaklaşık % 15'i ve sağlan Holstbayn ineklerinin ise yaklaşık % 5,8'inin mutant D128G alleleinin taşıyıcısı

olduğunu bildirilmiştir (Kehrli ve ark., 1992a; Kehrli ve ark., 1992c; Shuster ve ark., 1992). Shuster ve arkadaşlarının geliştirdikleri testin rutin olarak kullanılmasından sonra, 1993 yılında doğan boğalarda BLAD taşıyıcılarının oranının % 0,3 olduğu belirlenmiştir. Ayrıca hastalığın keşfinden ve moleküler teknikler kullanılarak mutant allelin kesin olarak belirlenmesinden önce doğan hayvanlar arasında, BLAD taşıyıcıları yüksek frekansa ulaştığı belirlenmiştir. Shuster ve arkadaşlarının BLAD'a neden olan mutant allelin kesin belirlenmesi için geliştirdikleri testten sonra, 1993 ve 1994 yılında damızlık olarak kullanılmaya başlayan boğaların % 68'i test edilmiş ve bunların hiçbirinin taşıyıcı olmadığı belirlenmiştir (Powell ve ark., 1996). A.B.D. de 1988 yılında, suni tohumlama istasyonlarında damızlık olarak kullanılmaya başlayan boğaların % 24'ünün, ineklerin ise % 9'unun BLAD taşıyıcısı olduğunu bildirilmiştir. (Powell ve Norman, 1998; Wanner ve ark., 1998). A.B.D. de 1997 yılında yapılan bir çalışmada, damızlık olarak kullanılan suni tohumlama boğalarında BLAD allelinin oranının % 11,3 olduğunu belirlemiştir (Kelm ve ark., 1997). Wanner ve arkadaşları (1998), inceledikleri 6400 damızlık boğanın % 8,2'sinin BLAD taşıyıcısı olduğunu belirlemiştirlerdir. Elde edilen bilgiler göstermektedir ki, BLAD'a neden olan mutant allelin damızlık boğalardaki frekansı kalıtsal bir hastalık olarak BLAD'in tanınması ve taşıyıcıların belirlenmesini sağlayacak uygun bir testin geliştirilmesini takip eden yıllarda azalmıştır. Gerek Shuster ve arkadaşlarının geliştirdiği PCR-RFLP testinin rutin olarak kullanılması, gerekse yetistaricilerin BLAD'in neden olduğu ekonomik kaybin farkında olmaları A.B.D.'de bu kalıtsal bozukluğun frekansını azaltmıştır. Oysa Türkiye'de gerek sahada çalışan veteriner hekimler, gerekse yetistariciler BLAD gibi kalıtsal hastalıklardan haberdar değillerdir. Bu da Türkiye de BLAD yaygınlığı hakkında fikir sahibi olunmasını engellemektedir.

A.B.D.'de rasgele seçilen ve hepsi sağlan 2000 den fazla inek ve 2000 den fazla düve arasında yapılan bir çalışmada, BLAD taşıyıcılık oranının düveler arasında daha fazla olduğu belirlenmiştir (Kehrli, 2000). Bunun nedeni A.B.D.'de damızlık adaylarının BLAD yönünden incelenerek taşıyıcıların damızlık olarak seçilmemeleri olabilir. Yine A.B.D. de yapılan çalışmada süt işletmelerinde yetiştirilen 1994

doğumlu dışilerde BLAD allelinin frekansının suni tohumlama istasyonlarında kullanılan boğalardan daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Arrayet ve ark., 2002). BLAD'ın tanınmasından sonra BLAD genini taşıyan ineklerin verimlerinin, homozigot normal ineklerden daha yüksek olduğuna inanılması ineklerde mutant allele frekansının artmasına neden olmuş olabilir (Powell ve ark., 1996; Fésüs ve ark., 1999; Jánosa ve ark., 1999). Ancak yapılan araştırmalar BLAD alleli ile verim özellikleri arasında pozitif bir ilişkinin olmadığını göstermiştir (Fésüs ve ark., 1999; Wanner ve ark., 1999). Mevcut moleküller genetik tanı yöntemleri BLAD taşıyıcılarının kesin olarak belirlenebilmesine olanak verir. Böylelikle taşıyıcı inekler homozigot normal boğaların spermaları ile tohumlanabilir. Doğan buzağılar eğer damızlık olarak kullanılacaksa BLAD yönünden incelenerek üretimde tutulabilir. Böylelikle üstün verim özelliklerine sahip taşıyıcı inek üretimde tutularak üstün verim özelliklerinden yararlanılabilir. Bu durumda dışı materyalde taşıyıcıların oranının yüksek olmasına neden olabilir.

Yapılan bu çalışmada yeteri kadar dışı materyal kullanılamadığı için Türkiye de yetişirilen Holştayn ineklerdeki BLAD durumu hakkında kesin bir yargıya varılamamıştır. Türkiye'de yetişirilen tüm Holştayn inekler BLAD yönünden incelenmesi teknik ve ekonomik olarak zordur. Ancak, Türkiye'de mutant BLAD allelinin eradikasyonu için en azından damızlık olarak seçilen boğa adaylarının annelerinin BLAD yönünden genotiplerinin kesin olarak belirlenmesi gereklidir.

Amerikan Holştayn Yetiştiricileri Birliğinin 1994 yılında yayınladığı raporda, A.B.D. de suni tohumlama istasyonlarındaki mevcut Holştayn boğalarının 355 başının BLAD taşıyıcısı olduğu bildirilmiştir. BLAD taşıyıcısı olan boğaların pedigrleri incelendiğinde, bu boğaların büyük çoğunluğunun birbirleri ile akraba olan Osborndale Ivanhoe, Carlin-M Ivanhoe Bell ve Penstate Ivanhoe Star isimli üç boğanın torunları oldukları belirlenmiştir (Steinholt ve ark., 1994). Türkiye'de yetişirilen hayvanların pedigri bilgileri düzenli tutulmadığı için taşıyıcı olarak belirlenen iki hayvanın akrabalıkları hakkında kesin bir bilgi bulunmamaktadır.

Macaristan'da, Jánosa ve arkadaşlarının 1999 yılında damızlık olarak kullanılan Holştayn boğalarda BLAD taşıyıcılarının belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada damızlık olarak kullanılan boğaların yaklaşık % 10'unun BLAD taşıyıcısı olduğunu belirlemiştirlerdir. Ayrıca yetiştiricilerin en çok tercih ettikleri 40 boğa arasından sıralamada 12. sırada bulunan boğanın da BLAD taşıyıcısı olduğunu belirlemiştir (Jánosa ve ark., 1999). Japonya'da damızlık olarak kullanılan Holştayn boğaları arasında BLAD taşıyıcılarının oranının yaklaşık olarak % 11 olduğu belirlenmiştir (Nagahata ve ark., 1997). Rusya'da 2000 yılında 171 boğa ve inek arasında yapılan bir çalışma sonucunda incelenen hayvanların 161 tanesi homozigot normal, 9'u boğa ve 1'i inek olmak üzere toplam 10 hayvanın ise mutant D128G alleli yönünden heterozigot oldukları belirlenmiştir. İncelenen bu populasyonda BLAD geninin frekansının 0,029 olduğu belirlenmiştir (Hofer ve ark., 2000). Benzer şekilde DNA kullanılarak yapılan inceleme ile Arjantin'de BLAD allelinin frekansı suni tohumlama boğalarında % 2,88, ineklerde ise % 1,79 olarak bulunmuştur (Poli ve ark., 1996). Türkiye'de yetiştirilen Holştayn ırkı sığırlarda kalıtsal BLAD bozukluğunun varlığının araştırılması için yapılan bu çalışmada ise kullanılan 118 boğa ve boğa adayının bir tanesinin BLAD taşıyıcısı olduğu belirlenmiştir. İncelenen iki Holştayn ineğinin BLAD taşıyıcısı olduğu belirlenmiştir. İncelenen toplam 120 baş Holştayn sığırda mutant BLAD allelinin frekansı 0,0084 olarak bulunmuştur. Mutant allelin frekansı diğer ülkelerdeki boğa ve boğa adayları için bildirilen frekanstan oldukça düşüktür. Ancak Türkiye'de yoğun olarak ithal Holştayn spermalarının kullanıldığı ve ithal ineklerin yetiştirildiği göz önüne alındığında mutant allelin frekansının daha yüksek bulunabileceği söylenebilir.

Macaristan'da ki suni tohumlama boğaları, boğa adaylarının ve boğa adaylarının anneleri BLAD'a neden olan mutant D128G alleli yönünden incelenmiştir. Sonuçta Macaristan'da yetiştirilen Holştaynlarda bu mutant allelin frekansının A.B.D.'de ki orana yakın olduğu belirlenmiştir. Macaristan'da ki Holştayn populasyonunun orijinini büyük ölçüde A.B.D.'ye dayandığı için benzer frekansın elde edilmesi beklenebilir (Fesus ve ark., 1999). Benzer şekilde Türkiye'de ki Holştaynlarda BLAD allelinin frekansının bulunandan daha yüksek olduğu sanılmaktadır. Çünkü

Türkiye'de sadece Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birliğine 40 ilde kayıtlı 1 112 543 baş saf Hoştayn sığırı bulunmaktadır. Ayrıca birliğin faaliyette olmadığı illerde ki saf Holştaynlar ve ırkın melezleri de dikkate alınırsa rakamın çok daha artacağı düşünülebilir. Macaristan'da yapılan çalışmada belirtildiğine benzer şekilde; Türkiye'de Holştayn yetiştirciliğine ilk olarak 1958 yılında A.B.D.'den getirilen 30 dişi ve 17 erkek dana ile başlanmıştır. Sonraki yıllarda gerek devlet eliyle gerekse şahıslar tarafından farklı zamanlarda Almanya ve Hollanda'dan Holştayn sığırlar getirilerek Türkiye'de ki mevcut Holştayn sığır populasyonu oluşturulmuştur (Alpan, 1993, s.:48). Başlangıçta sadece Marmara ve Ege bölgeleri bu ırkın yetiştirilme alanı olarak düşünülmüşken artık tüm Türkiye'de Holştayn sığırı yetiştirmektedir. Türkiye'de yetiştirilen Holştaynların getirildiği bu üç ülkede de BLAD yönünden taşıyıcılar ve homozigot BLAD vakaları bildirilmiştir. Bu çalışma sonucunda Türkiye'de BLAD allelinin varlığı kesin olarak ortaya konmuştur. Allelin frekansı hakkında güvenilir bir sonuç elde edebilmek için fazla sayıda materyalin incelenmesi gereklidir.

Holştayn populasyonunda BLAD allelinin varlığını belirleyen her ülke moleküller genetik testler kullanarak BLAD allelinin eradikasyonu için çalışmalar başlatmıştır (Kerhli ve ark., 1992a; Powell ve ark., 1996; Nagahata ve ark., 1997; Jánosa ve ark., 1999; Muraleedharan ve ark., 1999). Dolayısıyla, Türkiye'de damızlık olarak kullanılmak istenen her Holştayn buzağı BLAD yönünden taranmalı ve BLAD durumunun pedigree kartlarına işaretlenmesi gereklidir.

Yapılan çalışmada, iki inek incelenmiş ve birinin BLAD yönünden heterozigot olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu Türkiye'de yetiştirilen Holştayn inekler arasında BLAD allelinin frekansı hakkında yeterli bilgi vermez. Çok sayıda dişi materyal kullanılarak ineklerde BLAD allelinin frekansı hakkında kesin bir yargıya varılmalıdır. Çünkü yapılan çalışmalar göstermiştir ki BLAD allelinin frekansı erkeklerde dişilerden daha yüksektir (Poli ve ark., 1996; Wanner ve ark., 1998; Hofer ve ark., 2000). Bununla birlikte, Arrayet ve arkadaşları (2002) tarafından, BLAD allel frekansının ineklerde boğalardan daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Bu

çalışmada Türkiye'deki Holştayn inekler içinde de BLAD yönünden heterozigotların bulunabileceği sonucuna varılmıştır. Bu nedenle Türkiye'de ki Holştayn ineklerde BLAD allelinin frekansının belirlenmesine yönelik çalışmaların planlanması gerekmektedir.

Holştayn sığır ırkı, Dünya'daki süt endüstrisinde en çok tercih edilen dolayısıyla en yaygın sütçü sığır ırkıdır. Doğan erkek Holştayn buzağıların sadece % 14'ünün damızlık olarak kullanılması, ırk içindeki akrabalığı yükselmiştir (Mirck ve ark., 1995). Ayrıca projeni test yapılarak verimlerine göre sıralanan üstün verim özelliklerine sahip boğaların genetik materyal olarak yaygın kullanılması da genetik havuzun daralmasına neden olmaktadır. İrk içinde üstün verimli damızlıkların bu şekilde yaygın kullanılması, hayvanlar arasındaki genetik benzerliği arturmasının yanı sıra BLAD gibi resesif genetik bozuklukların yayılmasını da kolaylaştırmaktadır. Yani akrabalı yetiştirme resesif karakterli genetik bozuklukları determine eden genlerin frekansının artmasına neden olmaktadır. Nitekim A.B.D. de Holştayn ırkı bir boğadan köken alarak tüm dünyaya yayılan BLAD kalıtsal bozukluğu bakımından, dünyadaki Holştayn ırkı sığırların yaklaşık % 5,8'inin taşıyıcı olduğu tahmin edilmektedir (Shuster ve ark., 1992; Mirck ve ark., 1995; Jánosa ve ark., 1999).

A.B.D.'de her yıl doğan Holştayn buzağılarının arasında BLAD'lı buzağıların oranı % 0,2'den fazla olduğu tahmin edilmektedir(Shuster ve ark., 1992). BLAD, hayvansal üretimde kayıplara neden olan en önemli kalıtsal hastalıktır (Ryncarz ve ark., 1995). BLAD'lı buzağılar genellikle bir yaşı doldurmadan ölürler. Ölmeyerek hayatı kalan buzağılarda ise büyümeye geriliği ve düşük cinsel aktivite görülür. Amerika'daki 10 milyon sütçü sığırın % 80'i Hoştayndır. Bunlardan her yıl yaklaşık 16 000-20 000 arasında BLAD'lı buzağı doğar. Her buzağıının 300 dolar olduğu kabul edilirse A.B.D. de her yıl BLAD nedeniyle sadece buzağı ölümlerinin sebep olduğu ekonomik kayıp yaklaşık 5 milyon dolardır (Kehrli ve ark., 1992a; Gerardi, 1996; Kehrli, 2000).

Türkiye'de Damızlık Sığır Yetiştiricileri Merkez Birliği soy kütüğüne kayıtlı toplam 271 246 baş Holştayn inek vardır. Bunun dışında Türkiye'de ki sığır varlığının yaklaşık % 25 yani 2,5 milyon baş saf ve Holştayn melezidir. Shuster ve arkadaşlarının (1992) A.B.D.'de bildirdiğini ve her yıl % 0,2'si homozigot BLAD hastası buzağının doğduğu, bunlarında bir yaşına gelmeden öldüğü kabulünden hareketle Türkiye'de ki 271 246 baş holştayn inekten her yıl yaklaşık olarak 543 homozigot BLAD hastası buzağı doğacağı hesaplanabilir. Holştayn bir buzağının fiyatı yaklaşık olarak 540 000 000 TL olarak alınırsa, BLAD'lı yavruların ölmesi sonucu Türkiye'de her yıl yaklaşık 293 220 000 000 TL'lik ekonomik kayıp olduğu söylenebilir. Yapılan hesapta sadece birliğe kayıtlı hayvanlardan doğan saf Holştayn buzağlarının ölmesi sonucu karşılaşılan ekonomik kayıp dikkate alınmaktadır. Birliğe üye olmayan yetiştiricilerin sahip oldukları sığırlarda düşünülürse ekonomik kaybın çok daha büyük olduğu görülür. Bu hesaplamalara Holştayn melezlerinde ilave edilmesiyle ekonomik kayıp daha da artacaktır.

Bu hesaplamalar sadece hasta buzağların ölmesi sonucu karşılaşılan ekonomik kayıptır. Erken yaşta ölmeyip yaşayan buzaqlarda tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlar nedeniyle kullanılan ilaç ve veteriner hekim giderleri düşünüldüğünde ekonomik kayıp daha da büyüyecektir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Holştayn yetişiriciliği yapılan çiftliklerde ortaya çıkan hastalıkların, ilk olarak immun sistemleri bozulmuş olan BLAD'lı buzağıları etkileyerek ölmelerine neden olacağı söylenebilir. BLAD'ın kesin olarak ilaç tedavisi yoktur. Tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlara karşı antibiyotik tedavisi, koruyucu ve destekleyici sağaltım olarak uygulanabilir. Ancak bu sağaltım yöntemleri ile homozigot BLAD vakalarında ölüm engellenemez, sadece ertelenir. BLAD'ın insanlardaki karşılığı olan LAD kalıtsal bozukluğunun tedavisi ancak hasta bebeklere yapılacak kemik iliği nakli ile yapılabilir. Eğer kemik iliği nakli yapılmazsa hasta bebekler erken yaşta ölürlер. Gerardi (1996), BLAD vakalarında, kemik iliği nakli yapılarak normal lökositlerin elde edilebileceğini bildirmiştir. Benzer şekilde Nagahata ve arkadaşları (1998a), Japonya'da kemik iliği nakli yaptıkları BLAD'lı bir düveyi 28 ay takip edilmişlerdir. Sonuçta kemik iliği nakli yapılan bu düvenin nötrofil fonksiyonlarında ve klinik görünümünde bir iyileşme görüldüğü bildirilmiştir. Ancak bu tedavi şeklinin Veteriner Hekimlik alanında ekonomik olmadığı ve rutin olarak tedavide kullanılamayacağı da bir gerçekir. Dolayısıyla BLAD ve benzeri kalıtsal bozuklukların neden olduğu ekonomik kayıpları önlemenin tek yolu kalıtsal bozuklukların taşıyıcılarının önceden belirlenerek bunların yetişirme dışı bırakılmasıdır. Buna en güzel örnek Avustralya Holştayn populasyonundan yaygın kalıtsal bir bozukluk olan citrulinemianın eridikasyonudur.

Damızlık olarak kullanılacak boğa adayları seçilirken bu kalıtsal bozukluk yönünden homozigot sağlıklı olmaları aranan kriterlerden birisi olması gerekmektedir. İlk önce Damızlık Sığır Yetiştiricileri Merkez Birliğine üye yetiştircilerin sahip olduğu Holştayn ırkı ineklerden başlanarak Türkiye'deki tüm Holştaynlarda BLAD taraması yapılmalıdır. Bu sayede Türkiye'de yetiştirilen Holştaynların BLAD allelinin dağılımı kesin olarak belirlenerek olası "Heterozigot X Heterozigot" birleşimeler önlenebilir. Böylelikle de hasta buzağıların doğma olasılığı en aza indirilmiş olur.

Sonuç olarak BLAD ve benzeri kalıtsal bozukluklar, PCR-RFLP gibi moleküler genetik metodlar ile kolayca belirlenerek eliminé edilir. Kalıtsal bozuklukların belirlenmesinde DNA kullanılarak yapılan moleküller tanı yöntemleri, ne kadar yaygın ve ne kadar başarılı kullanılırsa, damızlık olarak kullanılan sınırlı gen havuzundaki istenmeyen kalıtsal özellikler o kadar başarılı bir şekilde populasyondan eliminé edilebilir.

Türkiye'de yetiştirilen Holştayn populasyonunda ve damızlık adaylarında BLAD geninin aranması rutin hale getirilebilir. Gerektiğinde Holştayn ırkı yetişkin sığır ve buzağılardan örnek alınarak, bu hayvanların BLAD durumları kesin olarak ortaya konabilir. Böylece Türkiye'de de BLAD kontrol programı uygulanabilecektir. Aynı zamanda Türkiye'de yetiştirilen holştayn melezlerinin de BLAD açısından genetik yapıları incelenebilir.

Yapılan bu çalışma ile daha önce Türkiye de varlığı hakkında herhangi bir bilgi bulunmayan BLAD'a neden olan allelin Türkiye de yetiştirilen Holştaynlarda da bulunduğu belirlenmiştir.

ÖZET

Türkiye'de Yetiştirilen Bazı Sığır Irklarında Sığır Lökosit Bağlanması Yetmezliğinin (BLAD) Restriksiyon Parçacık Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) ile Belirlenmesi.

Bu çalışmanın amacı Türkiye'de yetiştirilen bazı sığır ırklarında BLAD allelinin araştırılmasıdır. Bunun için kullanılan moleküller genetik testi Türkiye'de yerleştirmek ve Holştayn yetiştirciliğinde damızlık adayı buzağılarda BLAD taramasının rutin kullanımı için bilgi sağlamaktır.

Çalışmanın materyalini, Damızlık Sığır Yetiştiriciler Merkez Birliği ile Tarım Bakanlığının birlikte yürüttüğü projeni test kapsamındaki boğalar ve Damızlık Sığır Yetiştiriciler Birliğine üye çiftliklerdeki Holştayn boğa ve boğa adayları oluşturmuştur. Çalışma Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik A.B.D. Moleküler Genetik Laboratuvarında yapılmıştır. Çalışmada BLAD allelinin varlığı, PCR-RFLP metodu ile başarılı bir şekilde belirlenebileceği gösterilmiştir. Çalışmada toplam 120 baş Holştayn ve 20 baş İsviçre Esmeri, 20 baş Yerli Kara, 20 baş Boz İrk, 20 baş GAK ve 20 baş DAK sığırından alınan kanlar kullanılmıştır. Alınan kanlardan fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi ile DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA'lar Kriegesmann ve arkadaşlarının önerdiği primer kullanılarak PCR'de çoğaltılmıştır. Mutasyon bölgesini belirlemek için elde edilen PCR ürünleri *Taq I* endonükleaz enzimi ile kesilmiştir. Kesilen PCR ürünlerini % 2'lik agaroz jel de elektroforez yapılmıştır. İncelenen Holştayn ırkı sığırların bir boğa ve bir inek olmak üzere ikisinin BLAD yönünden taşıyıcı oldukları belirlenmiştir. İncelenen Holştaynlar içinde homozigot BLAD'lı bireye rastlanmamıştır. Çalışmada incelenen diğer ırklarda BLAD alleline rastlanmamıştır. Toplam 120 baş Holştayn sığırda, mutant BLAD allelinin frekansı 0,0084 olarak hesaplanmıştır.

Yapılan bu çalışma BLAD'ın Türkiye de yetiştirilen Holştaynlarda da bulunduğu bildiren ilk çalışmadir.

Anahtar Sözcükler: BLAD, Holştayn, PCR, restriksiyon enzimi, RFLP,

SUMMARY

Detection of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) in Some Turkish Cattle Breeds with Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

The purpose of this work was to study BLAD allele is present in some cattle breeds in Turkey. It was also intended to establish the molecular genetic test used for this reason in Turkey and to provide infrastructure for the routine use of BLAD screening in the calves which are breeding candidate stock in Holstein breed.

The material of the study consisted of the bulls used in the progeny testing program, carried out by The Cattle Breeders' Association of Turkey and the Ministry of Agriculture. The study was done in Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine Department of Genetics, Laboratory of Molecular Genetics. It was also concluded that PCR-RFLP method can be successfully used to screen the young breeding cattle whether they are carrying BLAD allele. The blood samples obtained from 120 Holstein, 20 Brown Swiss, 20 Anatolian Black, 20 Turkish Grey, 20 South Anatolian Red and 20 East Anatolian Red. The DNA isolation was made from the blood samples using the method of phenol-chloroform extraction. The isolated DNA materials were multiplied in PCR using the primer developed by Kriegsemann *et all.* In order to determine the area of mutation in PCR products, the PCR products were digested by *Taq I* endonuclease enzyme. The resulting fragments were analysed on 2 % agarose gel for the absence of a *Taq I* restriction site. It was found that one male and another female two of the Holstein cattle were heterozygote BLAD carriers. There was no homozygote BLAD animals. BLAD allele was not found in the other breeds used in the study. The mutant BLAD allele frequency in the 120 Holstein cattle calculation was 0.0084.

This is the first study reporting the presence of BLAD in Holstein cattle breed in Turkey.

Key Words: BLAD, Holstein, PCR, restriction enzyme, RFLP.

KAYNAKLAR

- ACKERMANN, M. R., KEHRLI, M.K.JR., MORFITT, D.C., (1993a). Venrtal Dermatitis and Vasculitis in A Calf with Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency. *JAVMA*, **202**(3): 413-415.
- ACKERMANN, M. R., KEHRLI, M.K.JR., HAVKINS, H.K., AMENSON, J.L., GALLAGHER, J.E., (1993b). Identification of β_2 Integrin in Bovine Neutrophils by Scanning Electrom Microscopy in Backscatter Mode and Transmission Electron Microscopy. *Vet. Pathol.*, **30**: 296-298.
- ACKERMANN, M.R., KEHRLI, M.K.JR., LAUFER, J.A., NUSZ, L.T., (1996). Alimentary and Respiratory Tract Lesions in Eight Medically Fragile Holstein Cattle with Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD). *Vet. Pathol.*, **33**: 273-281.
- ACKERMANN, M. R., BROGDEN, K.A., FLORANCE, A.F., KEHRLI, M.K.JR., (1999). Induction of CD18-Mediated Passage of Neutrophils by *Pasteurella haemolytica* in Pulmonary Bronchi and Bronchioles. *Infection and Immunity*, **67**(2): 659-663.
- AGERHOLM, J.S., HOUE, H., JØRGENSEN, C.B., BASSE, A., (1993). Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency in Danish Holstein-Friesian Cattle II. Patho-Anatoöical Description of Affected Calves. *Acta Vet. Scand.*, **34**: 237-243.
- ALPAN, O., (1993). Sığır Yetiştiriciliği ve Besiciliği, 3. Basım, s.: 48.
- ALPAN, O., AKCAN, A., POYRAZ, Ö. (1990). Temel Genetik, Ankara Üniversitesi.
- ANONİM 1, Em Tran Offers BLAD Test For Embryos (2000). Erişim: [<http://www.holsteinworld.com/briefs/5599BWBrief.htm>]. Erişim Tarihi: 22.08.2000.
- ANONİM 2, Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) (2000). Erişim: [<http://www.signagen.co.nz/technicalinfo.htm#>]. Erişim Tarihi 15. 08. 2000.
- ANONİM 3, BLAD (2000). Erişim: .
[<http://www.rosgen.co.uk/animal/cattle3.htm>] .
Erişim Tarihi: 15. 08. 2000.
- ANONİM 4, Vita-Tech DNA Diagnostic Service-Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) (2000). Erişim: [<http://www.vita-tech.com/DNA/blad.htm>] .
Erişim Tarihi: 16. 08. 2000.

ANONİM 5, Arc-Animal Improvement Institute (Arc-Aii), Irene, South Africa: Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) (2000).

Erişim: [<http://www.arc.agric.za/lnr/institutes/aii/blad.htm>]. Erişim Tarihi: 15. 08. 2000.

ANONİM 6. Leukocyte Adhesion Deficiency in Cattle, (2001). Erişim: [<http://www.fmv.ulg.ac.be/genmol/MODGEN/ChapterII/BLAD.htm>]. Erişim Tarihi: 13.Mart.2001

ARITÜRK, E. (1977). Genel Zootekni, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları 14, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, s.: 158-167.

ARRAYET, J.L., OBERBAUER, A.M., FAMULA, T.R., GARNETT, I., OLTJEN, J.W., IMHOOF, J., KEHRLİ, M.E., GRAHAM, T.W., (2002). Growth of Holstein Calves from Birth to 90 Days: The Infuluence of Dietary Zinc and BLAD Status. *J. Anim. Sci.*, **80**: 545-552.

BACK, A.L., KERKERING, M., BAKER, D., BAUER, T.R., EMBREE, L.J., HICKSTEIN, D.D., (1993). A Point Mutation Associated with Leukocyte Adhesion Deficiency Type 1 of Moderate Severity. *Biochemical and Biophyscal Research Communications*, **193**(3): 912-918.

BATT C.A., WAGNER, P., WIEDMANN, M., JIANYLING, L., GILBERT, R., (1994). Detection of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency by Nonisotopic Ligase Chain Reaction. *Animal Genetics*, **25**; 95-98.

COX, E., MAST, J., MACHUGH, N., SCHWENGER, B., GODEERIS, B.M., (1997). Expression of β_2 Integrins on Blood Leukocytes of Cows With or Without Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **58**:249-263.

DİKER K.S., (1998). İmmunoloji, Medisan Yayın Serisi:37, 1. Baskı, Ankara, s.: 95-96, 102-103.

ELANGBAM, C.S., QIALS, C.W., DAHLGREN, R.R., (1997). Cell Adhesion Molecules- Update. *Vet. Pathol.*, **34**: 61-73.

FÉSÜS, L., ZSOLNAI, A., ANTON, I., BÁRÁNY, I., BOZÓ, S., (1999). Short Communication BLAD Genotypes and Cow Production Traits in Hungarian Holsteins. *J. Anim. Breed. Genet.*, **116**: 169-174.

FREEMONT, A.J., HOYLAND, J.A., (1996). Cell Adhesion Molecules. *J. Clin. Pathol. Clin. Mol. Pathol.*, **49**(6): 312-330.

FRIES, R., RUVINSKY, A., (1999). The Genetics of Cattle, CABI Publishing, Wallingford, Chapter 6.

- GERARDI, A.S., (1995). Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency: A Review of a Modern Disease and Its Implications. *Research in Veterinary Science*, **61**; 183-186
- GILBERT, R.O., REBHUN, W.C., KIM, C.A., KEHRLİ, M.E., SHUSTER, D.E., ACKERMAN, M.R., (1993). Clinical Manifestation of Leukocyte Adhesion Deficiency in Cattle: 14 Cases (1977-1991). *JAVMA*, **202**(3): 445-449.
- HARLAN, J.M., (2001). Leukocyte Adhesion to The Vasculature. Erişim: [<http://courses.nus.edu.sg/Course/patleesh/ish/1996/020.pdf>] . Erişim Tarihi: 27.03.2001
- HEALY, P.J., (1992). Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD)- Another Genetic Defect of Holstein/Friesians. *Australian Veterinary Journal*, **69**(8); 190.
- HEALY, P.J., DENNIS, J.A., MOULES, J.F., (1995). Use of Hair Roots as a Source of DNA for The Detection of Heterozygotes for Recessive Defects in Cattle. *Australian Veterinary Journal*, **72**(10): 392.
- HOFER, A., VAN DER HONING, Y., MADEC, F., SERJSEN, K., PULLAR, D., BODIN, L.J., FERNANDEZ, A., BRUNS, E.W., (2000). Book of Abstracts of The 51st Annual Meeting of The European Association to Animal Production. Book of Abstracts No.6.(2000) The Hague, The Netherlands 21-24 August 2000 Wegeningen Pres. p.11.
- HUAN, C., SPRINGER, T.A., (1997). Folding of The β -Propeller Domain of The Integrin α_L Subunit is Independent of The I Domain and Dependent on The β_2 Subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 3162-3167.
- JÁNOSA, Á., BARANYAI, B., DOHY, J., (1999). Comparison of Milk Production of The Progeny of BLAD-Carrier and Healthy Holstein Bulls in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*, **47**(3): 283-289.
- JEYASEELAN, S., HSUAN, S.L., KANNAN, M.S., WALCHECK, B., WANG, J.F., KEHRLİ, M.E., LALLY, E.T., SIECK, G.C., MAHESWARAN, S.K., (2000). Lymphocyte Function-Associated Antigen 1 Is a Receptor for *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin in Bovine Keukocytes. *Infection and Immunity*, **68**(1): 72-79.
- JOHNSON L.K., (2000). ACVP Registry of Comparative Pathology. Erişim: [<http://www.afip.org/vetpath/WSC/WS94/94wsc05.htm>] . Erişim Tarihi: 28. 08. 2000.
- JØRGENSEN, C.B., AGERHOLM, J.S., PEDERSEN, J., THOMSEN, P.D., (1993). Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency in Danish Holstein-Friesian Cattle I. PCR Screening and Allele Frequency Estimation. *Acta Vet. Scand.*, **34**: 231-236.
- KANEKO, J.J., HARVEY, J.W., BRUSS, M.L., (1997). Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 5th Ed., Academic Press London, p.: 36-37.

KEHRLİ, M.E.JR., (2000). Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) in Holstein Cattle.
 Erişim:
 [<http://www.extension.iastate.edu/Pages/dairy/report95/health.html>]
 . Erişim Tarihi: 15. 08. 2000.

KEHRLİ, M.E., SCHMALSTIEG, F.C., ANDERSON, D.C., VAN DER MAATEN, M.J., HUGHES, B.J., ACKERMAN, M.R., WILHEMSEN, C.L., BROWN, G.B., STEVENS, M.G., WHETSTONE, C.A., (1990). Molecular Definition of The Bovine Granulocytopath Syndrome: Identification of Deficiency of The Mac-1 (CD11b/CD18) Glycoprotein. *Am. J. Vet. Res.*, **51**(11): 1826-1836.

KEHRLİ, M.E.JR., SHUSTER, D.E., ACKERMAN, M.R., (1992a). Leukocyte Adhesion Deficiency Among Holstein Cattle. *Cornel Vet.*, **82**(2): 103-109.

KEHRLİ, M.E., SHUSTER, D.E., ACKERMAN, M.R., (1992b). Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency: Molecular Basis for Diagnosis and Control of a Genetic Lethal Trait. Taken from The Proceedings of The 96th Annual Meeting of The United States Animal Health Association, Louisville, Kentucky. pp: 179-183.

KEHRLİ, M.K.JR., ACKERMANN, M. R., SHUSTER, D.E., VAN DER MAATEN, M.J., SCHMALSTIEG, F.C., ANDERSON, D.C., HUGHES, B.J., (1992c). Animal Model of Human Disease, Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency, β_2 Integrin Deficiency in Young Holstein Cattle. *American Journal of Pathology*, **140**(6): 1489-1492.

KEHRLİ, M.E.JR., ACKERMANN, M.R., SHUSTER, D.E., VAN DER MAATEN, M. J., SCHMALSTIEG, F.C., ANDERSON, D.C., HUGHES, B.J., (2000). Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency.
 Erişim: [<http://www.afip.org/rcp/cdr/15-BLAD.htm>]
 Erişim Tarihi: 16. 08. 2000.

KELM, S.C., DETILLEUX, J.C., FREEMAN, A.E., KEHRLİ, M.E., DIETZ, A.B., FOX, L.K., BUTLER, J.E., KASCKOVICS, I., KELLEY, D.H., (1997). Genetic Association Between Parameters of Innate Immunity and Measures of Mastitis in Periparturient Holstein Cattle. *J. Dairy Sci.*, **80**: 1767-1775.

KIJIAS, J.M.H., BAUER, T.R., GAFVERT, S., MARKUND, S., TROWALD-WIGH, G., JOHANNISSON, A., HEDHAMMAR, A., BINNS, M., JUNEJA, R.K., HICKSTEIN, D.D., ANDERSON,L., (1999). A Missense Mutation in The β -2 Integrin Gene (ITGB2) Causes Canine Leukocyte Adhesion Deficiency. *Genomics*, **61**: 101-107.

KIJIAS, J.M.H., JUNEJA, R.K., GAFVERT, S., ANDERSON,L., (2000). Detection of The Causal Mutation for Canine Leukocyte Adhesion Deficiency (CLAD) Using Prosequencing. *Animal Genetics*, **31**: 326-328.

- KOSTETSKII, I.E., KIRILENKO, S.M., GLAZKO, V.I., SOZINOV, A.A., (1996). A Diagnostic Analysis of a Genetic Mutation Associated with A Deficiency Leukocyte Adhesion in Cattle. *Tsitol Genet.*, **30**(2): 61-64.
- KRIEGESMANN, B., JANSEN, S., BAUMGARTNER, B.G., BRENIIG, B., (1997). Partial Genomic Structure of The Bovine CD18 Gene and The Refinement of Test for Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency. *J. Dairy Sci.*, **80**: 2547-2549.
- LEE, E.-K., KEHRLİ, M.E., (2003). Expression of Adhesion Molecules on Neutrophils of Periparturient cows and Neonatal Calves. Erişim: [<http://www.nadc.ars.usda.gov/virtconf/subpost/posters/G00018m.htm>] Erişim Tarihi: 18.Ocak.2003
- MATHEW, E.C., SHAW, J.M., BONILLA, F.A., LAW, S.K.A., WRIGHT, D.A., (2000). A Novel Point Mutation in CD18 Causing The Expression of Dysfunctional CD 11/CD18 Leucocyte Integrins in a Patient with Leucocyte Adhesion Deficiency (LAD). *Clin. Exp. Immunol.*, **121**: 133-138.
- McGREGOR, J., BERDEAUX, A., BONNET, J., CAMBIEN, F., FITZGERALD, D., LACOLLEY, P., LU, H., LE SAUX NARJOZ, A., MIOSSEC, P., NETTER, P., POSTON, R., LAURENT, S., (1998). Protheines d'Adhesion et Applications Pharmalogiques. *Therapie*, **53**: 371-379.
- MILLAR, P., LAUVERGNE, J.J., DOLLING, C., (2000). Mendelian Inheritance in Cattle. Wageningen Pres. Wageningen, The Netherlans, s.: 351-352.
- MIRCK, M.H., Von BANNISSEHT-WIJSMULLER, T.H., TIMMERMANS-BESSELINK, W.J.H., Van LUIJK, J.H.L., BUNTIER, J.B., LENSTRA, J.A., (1995). Optimization of The PCR Test for The Mutation Causing Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency. *Cell. Mol. Biol.*, **41**(5): 695-698.
- MUKHOPADHYAYA, P.N., MEHTA, H.H., RATHOD, R.N., (2000). A Methods for PCR-RFLP Screening of A Genetic Disease in Dairy Cattle. *Molecular and Cellular Probes*, **14**: 381-384.
- MURALEEDHARAN, P., KHODA, V., SVEN, G., MUKHAPADHYAYA, P.N., MANFRED, S., MEHTA, H.K., (1999). Incidence of Hereditary Citrullinemia and Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency Syndrome in Indian Dairy Cattle (*Bos taurus*, *Bos indicus*) and Buffalo (*Bubalus bubalis*) Population. *Arch. Tierz.*, **42**(4): 347-352.
- MÜLLER, K.E., HOEK, A., RUTTEN, A.P.M.G., BERNADINA, W.E., WENTINK, G.H., (1997). Antigen-Specific Immune Responses in Cattle with Inherited β_2 -Integrin Deficiency. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **58**: 39-53.
- NAGAHATA, H., MIURA, T., TAGAKI, K., OHTAKE, M., NODA, H., YASUDA, T., NIOKA, K., (1997). Prevalence and Allele Frequency Estimation of Bovine Leukocyte

Adhesion Deficiency (BLAD) in Holstein-Friesian Cattle in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, **59**(4): 233-238.

NAGAHATA, H., MATSUKI, S., HIGUCHI, H., INANAMI, O., KUWABARA, M., KOBAYASHI, K., (1998a). Bone Marrow Transplantation in A Holstein Heifer with Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency. *Vet. J.*, **156**(1): 15-21.

NAGAHATA, H., SAKURAI, N., MATSUKI, S., MIURA, T., NIOKA, K., KOCIBA, G.J., (1998b). Survival of Transfused CD18-Positive Granulocytes and Their Chemiluminescent Response in a Heifer with Adhesion Deficiency. *J. Vet. Med. Sci.*, **60**(2): 261-262.

NAGAHATA, H., HIGUCHI, H., YAMASHIKI, N., YAMAGUCHI, M., (2000). Analysis of The functional Characteristics of L-Selectin and Its Expression on Normal and CD18-Deficient Bovine Neutrophils. *Immunology and Cell Biology*, **78**: 264-271.

NICHOLAS, F.W., (1996). Introduction to Veterinary Genetics, Oxford University Press, Oxford.

OLCHOWY, T.W.J., BOCHSLER, P.N., WELBORN, M.G., (1994). Clinopathological Findings in a Holstein Calf With Periferal Leukocytosis and Leukocyte Adhesion Deficiency. *Can. Vet. J.*, **35**: 242-243.

ÖZBEYAZ, C., (1997). Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) Sığırlarda Bağışıklık Sistemi Yetmezliği. *Türk Veteriner Hekimliği Dergisi*, **9**(1): 6-8.

PHILLIPS, J.A., (1990). Diagnosis at The Bedside by Gene Analysis. *Southern Medical Journal*, **83**(8): 868-875.

PİR, İ., (2001). Hücre Adezyon Molekülleri ve Klinik Önemi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji ABD, I. Seminer, Ankara.

POLI, M.A., DEWEY, R., SEMORILE, L., LOZANO, M.E., ALBARINO, C.G., ROMANOWSKI, V., GRAU, O., (1996). PCR Screening for Cariers of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) and Uridine Monophosphate Synthase (DUMPS) in Argentine Holstein Cattle. *Zentralbl Veterinarmed A*, **43**(3): 163-168.

POWELL, R.L., NORMAN, H.D., COWAN, C.M., (1996). Relationship of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency with Genetic Merit for Performance Traits. *J. Dairy Sci.*, **79**: 895-899.

RADI, Z.A., REGISTER, K.B., LEE, E.-K., KEHRLİ, M.E., BROGDEN, K.A., GALLUP, J.M., ACKERMANN, M.R., (1999). In Situ Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) mRNA in Calves with Acute *Pasteurella haemolytica* Pneumonia. *Vet. Pathol.*, **36**: 437-444.

- ROOS D., LAW, S.K.A., (2001). Hematologically Important Mutations: Leukocyte Adhesion Deficiency. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, **27**(6): 1000-1004.
- RUTTEN, V.P.M.G., HOEK, A., MÜLLER, K.E., (1996). Identification of Monoclonal Antibodies with Specificity to α - or β -Chains of β_2 -Integrins Using Peripheral Blood Leucocytes of Normal and Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) Cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **52**:341-345.
- RYNCARZ, R.E., DIETZİ A.B., KEHRLİ, M.K.JR., (1995). Recognition of Leukochimerism During Genotyping for Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) by Polymerase-Chain-Reaction-Amplified DNA Extracted from Blood. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **7**: 569-572.
- SAĞLAM, M., AŞTİ, R.N., ÖZER, A., (1997). Genel Histoloji Ders Kitabı. 5. Baskı, Yorum Matbaacılık Sanayi, Ankara, s.:220-222.
- SAMPSON, J., PHIL, D., (2000). CLAD in The Irish Setter. Erişim: [<http://www.isbc.org.uk/health.htm>] . Erişim Tarihi: 15. 08. 2000.
- SHUSTER, D.E., KEHRLİ, M.K.JR., ACKERMANN, M. R., GILBERT, R., (1992). Identification and Prevalence of A Genetic Defect That Causes Leukocyte Adhesion Deficiency in Holstein Cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 9225-9229.
- SOETHOUT, E.C., MÜLLER, K.E., RUTTEN, V.P.M.G., (2002). Neutrophil Migration in The Lung, General and Bovine-Specific Aspects. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **87**(3-4): 277-285.
- SPES, K.M., EDENS, H.A., KEHRLİ, M.E.JR., MIETTINEN, H.M., CUTLER, J.E., JULITA, M.A., QUINN, M.T., (1999). Analysis of Surface Antigen Expression and Host Defence Function in Leukocytes from Calves Heterozygous or Homozygous for Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency. *Am. J. Vet. Res.*, **60**: 1255-1261.
- SPES, K.M., EDENS, H., KEHRLİ, M.E., CUTLER, J.E., MIETTINEN, H.M., JUTILA, M.A., QUINN, M.T., Enhanced NADPH Oxidase Activity in Neutrophils Isolated from Cattle with Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (2001). Erişim: [<http://www.nadc.ars.usda.gov/virtconf/subpost/posters/G00040.htm>] Erişim Tarihi: 14.Mart.2001.
- SPRINGER, T.A., (1990). Adhesion Receptors of The Immune System. *Nature*, **346**: 425-434.
- STEINHOLT, H.C., CHANDLER, J.E., BARON, R.A., ADKINSON.R.W., (1994). Chromosome and Sperm Size of Holstein with and Without Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency. *J. Dairy Sci.*, **77**: 1239-1250.

- TAJIMA, M., IRIE, M., KIRISAWA, R., HAGIWARA, K., KUROSAWA, T., TAKAHASHI, K., (1993). The Detection of a Mutation of CD18 Gene in Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD). *J. Vet. Med. Sci.*, **55**(1): 145-146.
- TAMMEN, I., KLIPPERT, H., KUCZKA, A., TREVIRANUS, A., POHLENZ, J., STÖBER, M., SIMON, D., HARLIZIUS, B., (1996). An Improved DNA Test for Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency. *Research in Veterinary Science*, **60**: 218-221.
- UYDAL, H. (1995). Extracellular Matrix Glicoproteins of Skin Fibroblast in Tuberous Sclerosis. Doktora Tezi Nothingam Üniversitesi Biokimya Bölümü, İngiltere.
- VAN VLECK, D.L., POLLAK, E.J., OLTENACU, E.A.B., (1987). Genetics for the Animal Sciences, W.H. Freeman and Company New York, Chapter 8.
- WANNER, J.M., ROJERS, G.W., KEHRLI, M.E., COOPER, J.B., (1998). Intramammary Infections in Primiparous Holsteins: Heritabilities and Comparisons of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency. Carriers and Noncarriers. *J. Dairy Sci.*, **81**: 3293-3299.
- WANNER, J.M., ROGERS, G.W., KEHRLI, M.E., COOPER, J.B., (1999). Clinical Mastitis in Primiparous Holstein: Comparisons of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency Carriers and Noncarriers. *J. Dairy Sci.*, **82**:2517-2523.
- ZSOLNAI, A., FÈSÜS, L., (1996). Simultaneous Analysis of Bovine K-Casein and BLAD Alleles by Multiplex PCR Followed by Parallel Digestion with Two Restriction Enzymes. *Animal Genetics*, **27**: 207-209.
- ZSOLNAI, A., FÈSÜS, L., (1997). Enhancement of PCR-RFLP Typing of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency. *BioTechniques*, **23**: 380-382.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

| | |
|-----------------------------|--|
| Adı | : Bilal |
| Soyadı | : AKYÜZ |
| Doğum yeri ve tarihi | : Ankara 04. 08. 1972 |
| Uyruğu | : T.C. |
| Medeni durumu | : Evli |
| Askerlik durumu | : Askerlik hizmetini yapmış |
| İletişim adresi ve telefonu | : Ahmet Şefik Kolaylı Cad. 2. Sok. Tuncay Apt. 13/6 Esertepe/Ankara. 0 312 323 08 08 |

II- Eğitim (tarih sırasına göre yeniden eskiye doğru)

| | |
|-----------------------|---|
| Mezun olduğu okullar: | 17. 07. 1995 Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi 1989 Gülveren Lisesi (Ankara) |
| | 1986 Altmışinci Yıl İlköğretim Okulu (Ankara) |
| | 1981 Akagündüz İlk Okulu (Ankara) |

Yabancı dil : İngilizce

III- Ünvanları (tarih sırasına göre yeniden eskiye doğru)

IV- Mesleki Deneyimi

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları: Ertuğrul O., Akyüz, B.: Halk Elinde Yetiştirilen Ankara Keçilerinde (*Capra hircus*) Bazı Kan Protein Polimorfizmi. Ankara Ü. Vet.Fak. Derg. 47 (1),23-29, 2000

Akyüz, B., Güneren G., Özdemir E., Ertuğrul O., Özdemir S.,: Bildircinlarda Akrabalığın Saptanmasında Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA Parmak İzi Yönteminin Kullanılma Olanakları, Ankara Ü. Vet.Fak. Derg. 49 (2), 129-134, 2002

Ertuğrul O., Akyüz, B., Kopar A.,; Blood Protein Polymorphism in Some Native Horse Types in Turkey. XXVIII International Conference on Animal Genetics, Göttingen-Germany 2002 (D031 Numaralı Poster).

Ertuğrul O., Güneren G., Akyüz, B.: A Study on DNA Fingerprinting of the Native Cattle Breeds in Turkey by RAPD-PCR. EAAP-54th Annual Meeting, Rome 2003 (G3.18 Numaralı Poster).

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Projeleri: TÜBİTAK ve Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü tarafından desteklenen VHAG-1918 ve 2002-7 numaralı proje.

Ertuğrul O., Akyüz B., Çabuk B.,: Türkiye'de ki Holştayn Sığırlarında Sığır Lökosit Bağlanma Yetmezliğinin (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency, BLAD) Restiriksiyon Parçacık Uzunluk Polimorfizmi (Restiriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) ile Belirlenmesi.

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü tarafından desteklenen 2002-45 numaralı proje.

Ertuğrul O., Akyüz B., Kaplan G., Çabuk B.,: Türkiye'de Yetiştirilen Holştayn Sığırlarında Uridine Monophosphate Syntase Eksikliği (DUMPS) Genini Taşıyan Sığırların Moleküller Genetik Tekniklerle Belirlenmesi.

VIII- Diğer Bilgiler