



Parvoviral Enteristisli Köpeklerde Endotel Hücre Spesifik Molekül-1 (Endocan) Düzeyleri*

Mehmet Mustafa OFLAZ^{1,a}, Vehbi GÜNEŞ^{2,b}

¹Tarım ve Orman Bakanlığı, Kahramanmaraş İl Tarım ve Orman Müdürlüğü, Andırın İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü, Kahramanmaraş-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE
ORCID: ^a0000-0003-3235-6151; ^b0000-0002-4047-4409

Sorumlu yazar: Vehbi GÜNEŞ; E-posta: vgunes@erciyes.edu.tr

Atıf yapmak için: Oflaz MM, Güneş V. Parvoviral enteristisli köpeklerde endotel hücre spesifik molekül-1 (endocan) düzeyleri. Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg. 2024; 21(3):176-183

Öz: Endocan veya Endotelial Hücre Spesifik Molekül-1 (ESM-1), hücre adezyonu, inflamasyon ve tümör gelişimi gibi süreçlerin düzenlenmesinde anahtar bir rol oynadığı kanıtlanmıştır. Bu çalışmada proinflamatuvar ve proanjiojenik moleküllerin varlığında Endocan düzeylerindeki artış nedeniyle Parvoviral Enteritis'li (PVE) köpeklerde potansiyel yangısal biyobelirteç rolünün araştırılması amaçlandı. Çalışmaya 6-20 haftalık, farklı ırklarda, 40 adet (24 erkek, 16 dişi) ishal (kanlı/kansız), halsizlik şikâyeti bulunan ve köpek parvovirüs (CPV) antijen pozitif köpek dâhil edildi. Kontrol grubunu; 20 adet sağlıklı köpek (12 erkek, 8 dişi) oluşturdu. Tüm köpeklerin serum örneklerinde; Endocan, IL-6 ve CRP düzeyleri sandwich ELISA metodu ile analiz edildi. Ortalama Endocan düzeylerinin PVE'li köpeklerde (68.07 ng/L; 17.30-115.55) sağlıklı gruba göre (11.92 ng/L; 10.32-13.58) istatistiksel açıdan ($P<0.001$) anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptandı. Hasta grubundaki hem ortalama CRP düzeyi (20.87±6.34 mg/L), hem de ortalama IL-6 düzeyleri (2.32±0.84 pg/ml), sağlıklılardan (2.24±0.66 mg/L ve 1.07±0.61 pg/ml) istatistiksel açıdan önemli oranda ($P<0.01$) yüksekti. Ayrıca Endocan ile CRP düzeyleri ve IL-6 değerleri arasındaki pozitif korelasyonlar nedeni ile Endocan'ın yangısal sürecin sistemik bir bileşeni olduğu değerlendirildi. Sonuçta PVE'li köpeklerde Endocan düzeylerinin hastalarda önemli bir biyobelirteç olduğunu destekleyen bulgular elde edildi.

Anahtar kelimeler: Biyobelirteç, endocan, köpek, parvoviral enteritis

Endothelial Cell Specific Molecule-1 (Endocan) Levels in Dogs with Parvoviral Enteritis

Abstract: Endocan or Endothelial Cell Specific Molecule-1 (ESM-1) has been proven to play a key role in the regulation of processes such as cell adhesion, inflammation and tumor development. In this study, we aimed to investigate the role of Endocan as a potential inflammatory biomarker in dogs with Parvoviral Enteritis (PVE) due to increased Endocan levels in the presence of proinflammatory and proangiogenic molecules. The study included 40 dogs (24 males, 16 females), 6-20 weeks old, of different breeds, with diarrhea (bloody/bloodless), weakness and canine parvovirus (CPV) antigen positive dogs. The control group consisted of 20 healthy dogs (12 males, 8 females). Endocan, IL-6 and CRP levels in serum samples of all dogs were analyzed by sandwich ELISA method. Mean Endocan levels were significantly higher in dogs with PVE (68.07 ng/L; 17.30-115.55) compared to the healthy group (11.92 ng/L; 10.32-13.58) ($P<0.001$). Both mean CRP level (20.87±6.34 mg/L) and mean IL-6 levels (2.32±0.84 pg/ml) in the patient group were statistically significantly ($P<0.01$) higher than the healthy group (2.24±0.66 mg/L and 1.07±0.61 pg/ml). In addition, due to the positive correlations between Endocan and CRP levels and IL-6 values, Endocan was considered to be a systemic component of the inflammatory process. In conclusion, findings supporting that Endocan levels in dogs with parvoviral enteritis is an important biomarker in patients were obtained.

Keywords: Biomarker, dog, endocan, parvoviral enteritis

Giriş

Köpek/Canine parvovirüs (CPV) enfeksiyonu akut, bulaşıcı ve ölümcül viral bir hastalık olup, nadiren yetişkin köpeklerde görülmekle birlikte; çoğunlukla 6-20 haftalık yaş grubundaki genç aşılanmamış veya eksik aşılanmış köpeklerde yaygındır. Hastalık akut, fibrinli, nekrotik ve hemorajik enteritis bazen de myokarditis ile seyreder. Etken zarfsız, tek sarmallı bir DNA virüsü olup, günümüzde CPV-2a ve CPV-2b

serotiplerinin dünya genelinde salgınlara, klinik hastalığa ve ölümlere neden olduğu bildirilmektedir (Charoenkul ve ark., 2019). İlk kez 2000 yılında tespit edilen daha virulent olan CPV-2c adı verilen üçüncü bir suş da dünya genelinde giderek yayılmaktadır (Polat ve ark., 2019). Canine parvovirüs, viral replikasyon amacıyla; bağırsak kript hücrelerini, myokard ve lenfoid organları hedefler. Parvoviral enteritisin en yaygın klinik belirtileri nonspesifik olup anoreksi, depresyon, ateş, letarji, iştahsızlık, kusma ve ilk klinik belirtilerden sonraki 24-48 saat içinde gelişen ince bağırsak ishalidir. İshalin görünümü yumuşak mukoid bir sıvı veya çoğunlukla kanamalıdır (Prittie, 2004;

Geliş Tarihi/Submission Date : 07.03.2024

Kabul Tarihi/Accepted Date : 26.08.2024

*Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından desteklenen TYL-2021-9233 kodlu projeden özetlenmiştir.

Lamm ve ark., 2008). Gastrointestinal sıvı kayıpları ile hipovolemik şoka ilerleyen intersitisyel dehidratasyon hızla meydana gelebilir. Klinik belirtilerin şiddeti yaşa, koruyucu antikor titresine ve hastalık süresine göre değişebilir. Klinik belirtilere ek olarak, fiziki muayenede mukozal solgunluk, gecikmiş kapiller dolun zamanı, ateş veya hipotermi ve abdominal ağrı görülebilir. Bazı olgularda ince bağırsak invaginasyonu ve buna bağlı karın palpasyonunda ağrılı, sert, tübüler yumuşak doku kitlesi belirlenebilir (Rallis ve ark., 2000; Mazzaferro, 2020). Etkilenen hayvanlarda bağırsaklık sisteminin yetersizliği, bağırsak bakterilerinin translokasyonundan kaynaklanan bakteriyemi ile birleştiğinde, septik şok, sistemik inflamatuvar yanıt sendromu, multiorgan yetmezliği ve tedavi edilmezse ölüm riski ortaya çıkar (Goddard ve Leisewitz, 2010; Ford ve ark., 2017). Bu nedenle parvoviral enteritis olgularında patogeneze ve prognozda yangısal süreç ve sepsis gelişimi önemli rol oynar.

Endotel hücreleri sepsis patogenezinde önemli bir role sahiptir. Endotelden salınan Endocan'ın (endotel hücre spesifik molekül-1, ESM-1), insanlardaki sepsis çalışmasında düzeylerinin anlamlı olarak yükseldiği, ayrıca endotel disfonksiyonunu, multiorgan yetmezliğini ve sepsisteki sağ kalımı göstermede iyi bir biyobelirteç olduğu kanıtlanmıştır (Büyüktiryaki ve ark., 2017). Endocan'ın, başlıca akciğer damar sisteminden eksprese edildiği de gösterilmiştir. Yapısal olarak, Endocan/ESM-1, ICAM-1 ve LFA-1 integrinleri ile etkileşime girebilen ve dolayısıyla yangısal olayları önleyen 50 kDa'lık bir proteoglikandır. Vazküler endotelin; iltihaplanma, pıhtılaşma, anjiyogenez ve tümör invazyonunda, öncelikle reseptör/ligand etkileşimlerinin ayarlanması ile ve farklı mediyatörlerin sekresyonunda önemli bir rol oynadığı saptanmıştır (Hsu ve ark., 2019). Naseri ve ark. (2020) tarafından CPV'li köpeklerde Endocan düzeylerinin, sağlıklı köpeklere kıyasla CPV'li köpeklerde daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca ölen köpeklerde yüksek Endocan düzeylerinin saptanması nedeniyle CPV'li köpeklerde mortaliteyi tahmin etmek için prognostik bir biyobelirteç olabileceğini belirtmişlerdir (Naseri ve ark., 2020).

Parvoviral enteritis'li (PVE) hastalarda endotelial hücreler üzerine endotoksin veya sitokin aracılı prokoagulant etkinin oluşabileceği bildirilmektedir. Hırsız bağırsak duvarı ve villus atrofisine bağlı malabsorpsiyona; sıvı ve protein kaybına, bakteriyel sepsis ve endotoksemiye neden olur. Bu tablo da hızlı bir şekilde şok ve ölüme yol açabilir. Bu nedenle Endocan gibi damar endotelinden köken alan bir biyobelirtecin PVE'li köpeklerde koagulopati ve sepsis gibi nedenlerle kandaki düzeylerinin artması beklenebilir. Bu açıdan parvoviral enteritis gibi sistemik hastalığa neden olan köpeklerde teşhis ve prognozda önemli olduğu düşünülen Endocan'ın etkinliğinin ortaya konulması ilişkili sitokin ve akut faz yanıtın birlikte değerlendirilmesi önemlidir. Yaygın olarak CPV ile enfekte olmuş köpeklerde çeşitli patolojik biyobelirteçler

araştırılmaya devam etmektedir. Genellikle testlerin morbidite veya mortaliteyi tahmin etmede tek başına yararlı olmayacağı belirtilmektedir (Kocatürk ve ark., 2010; McClure ve ark., 2013). Bu nedenle PVE'in patogenezinde rol oynayan yeni ve güvenilir biyobelirteçlerin araştırılması ilgi çekici olmaya devam etmektedir.

Endotel hücreleri tarafından eksprese edilen Endocan, yangısal süreçlerde endotel disfonksiyonu için yeni bir biyobelirteç olabileceği ifade edilmesi nedeniyle, bu çalışmada doğal parvovirüs enfeksiyonu (CPE) geçirmekte olan hasta köpeklerin plazma örneklerinde yangısal bir biyobelirteç olarak Endocan düzeyleri ile ilişkili sitokin (IL-6) ve akut faz proteini (CRP) düzeylerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada, Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıklar Anabilim Dalı, Küçük Hayvan Hastanesine tedavi amacıyla getirilen, sahipleri tarafından çalışmaya katılma onayı alındıktan sonra PVE tanısı konulan ve sağlık kontrollerinde sağlıklı olduğu belirlenen köpeklerden elde edilen kan numuneleri ve hayvanlara ait veriler kullanıldı. Çalışma öncesi Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na (EÜHADYEK) başvuruldu. Hayvan deneyleri yerel etik kurulu tarafından verilen 18/008 sayılı kararı ile çalışma gerçekleştirildi.

Çalışma grupları ve örnek alımları

Çalışmaya, 6-20 haftalık yaşlarda, farklı ırklarda, 24 erkek ve 16 dişi olmak üzere toplam 40 adet CPV antijen pozitif köpek dâhil edildi. Kontrol grubunu ise; aynı yaş aralığında olan 12 erkek ve 8 dişi toplam 20 adet sağlıklı köpek oluşturdu. Köpeklerde altı haftalık yaştan sonra parvovirusun neden olduğu hastalığın genel klinik belirtilerinden olan; anoreksi, kusma, ishal (sıkça hemorajik) ve letarji belirtileri gösteren; dehidrasyon, ateş ve solgun mukoz membranları bulunan köpekler ile lökopeni, anemi, panhipoproteini ve hipoglisemi gibi laboratuvar bulguları olan hasta köpekler ile CPV antijen pozitif köpekler bu araştırmaya dâhil edildiler. Dört ila altı haftadan önceki yaşlar da enteritisten daha çok solumum güçlüğü (dispne) ve myokarditis nedeniyle ani ölüm geliştiği için bu köpekler araştırma dışı bırakıldılar. Ayrıca Campylobacteriosis, clostridiosis, giardiasis ve isospora enfeksiyonları gibi parvovirus dışında gastroenteritis ve kusma semptomlarına yol açan bakteriyel ve paraziter etkenleri barındıran köpekler de çalışma dışı bırakıldı.

Hasta grubunda ortalama 6-9 ay arasında, farklı ırklarda (Golden Retriever, Cocker Spaniel, Rottweiler, Melez, Kangal melezi, Terrier, Beagle, Cavalier King Charles, Border Collie) ve cinsiyette (Erkek, n=24; Dişi, n=16) akut PVE'li köpekler yer aldı. Sağlıklı kontrol grubunu ise sağlık kontrolü amacıyla kliniğe

getirilen ortalama 5-8 aylık, farklı ırklarda (Rottweiler, French Bulldog, Melez, Kangal, Pomerian, Alman Çoban Köpeği, Belçika Malinois) ve cinsiyette (Erkek, n=12; Dişi, n=8) tamamen sağlıklı köpekler oluşturdu.

Hasta ve Kontrol grubu köpeklerin ilk olarak klinik muayeneleri yapılarak beden ısısı, kalp ve solunum sayıları ölçüldü. Klinik olarak iştahsızlık, depresyon, durgunluk, kusma ve kanlı ishal semptomları gösteren hayvanlardan kliniğe getirildikleri gün ve tek seferde olmak üzere antikoagülanlı (EDTA) ve boş tüplere sefalik venden kan örnekleri alındı. Köpeklerden rektal swap ile dışkı örnekleri alındı ve örnekler parvovirus antijeni yönünden hızlı tanı testine (Asan Pharm Parvo, CPV Ag, Güney Kore) tabi tutuldu. Test sonucu parvovirus antijeni yönünden pozitif olan hastalar tez çalışmasının çalışma grubuna dâhil edildi.

Serum biyokimya ve ELISA analizleri

Hematolojik analizler Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi Klinik Hematoloji ve Biyokimya Laboratuvarında bulunan tam kan sayım cihazında (Mindray BC2800), biyokimyasal analizler ise aynı birimdeki biyokimya analizöründe (Randox Monaco) gerçekleştirildi. Kan CRP, IL-6, Endocan ve biyokimyasal analizler için sefalik ven'den vakumlu, jelli kan toplama tüplerine (Hemolab BD) 5'er ml kan örneği alındı. Alınan kan örneği 15 dakika oda ısısında bekletildikten sonra santrifüj (Hettich, Zentrifugen) edilerek (3000xrpm, 15 dakika) serum örnekleri çıkartıldı. Kan CRP, IL-6 ve Endocan ELISA testlerinin ölçümünde kullanılacak plazma ve serumlar her bir örnek için iki ependorf olmak üzere ve her bir ependorfda 500 µl plazma ve serum örneği olacak biçimde analiz işlemine kadar -20°C de depolandı. ELISA analizleri ilk örnek alınımından sonraki sekizinci ayda tamamlandı. Serum örneklerinde BUN, Total Protein, GGT, Glukoz, Kreatinin, AST, ALP ve Albumin değerleri analiz edildi.

Çalışma ve kontrol köpeklerden alınan serum örneklerinden CRP (201-15-0161/SunRedBio), IL-6 (201-15-0128/SunRedBio), Endocan (SRB-T-87983/SunRedBio) analizleri belirtilen ticari test kiti olarak yapıldı. Kantitatif ELISA yöntemiyle test prosedürüne göre analiz edildi ve sonuçlar Biotek ELx800 ELISA cihazında 450 nm'de okundu.

İstatistiksel analizler

Verilerin istatistiksel analizi Statistical Package for the Social Sciences (SPSS for Windows version 25.0) paket programı ile yapıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi, Q-Q ve histogram grafikleri ile belirlendi. Normal dağılım gösteren değişkenler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. Normal dağılım göstermeyen değişkenler ise ortanca (25th-75th yüzdelik) olarak ifade edildi. Ayrıca varyansların homojenliği Levene testi ile kontrol edildi. CRP,

IL-6 ve Endocan değişkenleri açısından hasta ve sağlıklı gruplar bağımsız iki örneklem t testi (student t testi) ile analiz edildi. Normal dağılım göstermeyen veriler ise Mann-Whitney U testi ile analiz edildi. Parvoviruslu ve sağlıklı köpeklerde Endocan düzeylerinin duyarlılık ve özgüllükleri hesaplandı. Bu köpeklerde Endocan eşik değerinin belirlenmesi için ROC eğrisi analizi yapıldı. Endocan'ın Parvoviral enfeksiyonların patogeneğinde rol alan bir biyobelirteç olup olmadığı ve köpeklerde infeksiyöz durumların takibi için kullanılan CRP düzeylerine göre muhtemel avantaj ve dezavantajları araştırmak amacıyla pearson korelasyonu uygulandı. İstatistiksel farklılığın P<0.05 olması anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Klinik bulgular

Çalışma grubunu oluşturan köpeklerin tümünde durgunluk, depresyon, hipertermi (10 olgu), letarji, kusma, diyare ve hemorajik diyare gözlemlendi. Ayrıca tedavinin ikinci gününden itibaren kanlı ishal görülmeyen vakalarda kanlı ishal de görüldü. Tedavinin ilk günü uygulanan tedaviden sonra 25 olguda kusma sıklığında azalma gözlemlendi. Nispeten ishale azalma ve çevreye olan ilgilerinde artış tespit edildi. Hastalara üçüncü günden itibaren yüksek enerjili bir diyet ile besleme yapıldı. Bazı hastalar tedaviye 72. saatin sonunda cevap vermeye başladılar ve iştah geri geldi. Bu hastalara yüksek enerjili diyete ancak o zaman geçilebildi. Çalışma grubundaki 11 köpekte tedaviye rağmen düzelme gözlenmedi ve hastaneye getirilmelerinden sonraki 1. ve 2. günlerde öldüler. Parvovirus enfeksiyonu olan çalışma grubu köpeklerinde ortalama vücut sıcaklığı, ortalama solunum sayısı ve ortalama nabız sayısı düzeyleri sağlıklı köpeklerden istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde daha yüksek bulundu (P<0.001).

Hematoloji ve serum biyokimya analizi bulguları

Ortalama WBC, lenfosit, granülosit, RBC, hemogloblin (Hgb) ve trombosit (Plt) değerleri açısından çalışma grubunda elde edilen düzeylerin kontrol grubuna göre düşük seyrettiği belirlendi. Özellikle WBC, monosit ve granülosit değerlerinin ortalamasının CPV'li köpeklerde istatistiksel açıdan anlamlı oranda düşük (P<0.001) ve PLT değerlerinin ortalamasının istatistiksel açıdan önemli oranda yüksek olduğu belirlendi (P<0.001).

Çalışma grubuna ait biyokimyasal analiz bulgularında birtakım sapmalar gözlemlendi. Özellikle total protein, albümin, glukoz, kreatinin ve ALP düzeyleri kontrol grubuna göre farklıydı. Belirlenen biyokimyasal değişiklikler; hipoproteinemi, düşük kreatinin, hiperglisemi, ALP aktivitesinde artış ve albümin düzeylerinde düşme olarak kaydedildi.

Serum Endocan, CRP ve IL-6 bulguları

Ortanca Endocan konsantrasyonunun PVE'li köpeklerde 68.07 ng/L (17.30-115.55) ve sağlıklılarda ise 11.92 ng/L (10.32-13.58) olduğu saptandı. Hasta grubunun ortanca Endocan seviyesi sağlıklı grubun ortanca değerinden istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde yüksekti ($P<0.001$). Ortalama CRP düzeyleri ise PVE'li köpeklerde 20.87 ± 6.34 mg/L, sağlıklılarda 2.24 ± 0.66 mg/L idi. Ortalama IL-6 düzeyi hasta köpeklerde 2.32 ± 0.84 pg/ml, sağlıklılarda ise 1.07 ± 0.61 pg/ml idi. Hasta grubunun ortalama CRP ve IL-6 düzeyleri, sağlıklılardan istatistiksel açıdan önemli oranda ($P<0.01$) farklıydı (Tablo 1).

ROC analiz grafiği (Şekil 1) ve gruplar arası Endocan sonuçlarını gösteren grafik (Şekil 2) aşağıda verilmiştir. Tanı performansları açısından CRP'nin en iyi ayırt edici belirteç olduğu görüldü. Endocan'ın ise gerçek pozitiflik oranının ya da duyarlılığının IL-6'ya göre daha iyi olduğu, fakat CRP'ye göre daha düşük olduğu saptandı.

Tablo 1. Gruplar arası ortalama/ortanca Endocan, IL-6 ve CRP konsantrasyonlarının karşılaştırılması

Parametreler	Kontrol Grubu (n=20)	Çalışma Grubu (n=40)	P değeri
Endocan (ng/L)	11.92 (10.32-13.58)	68.07 (17.30-115.55)	<0.001
CRP (mg/L)	2.24 ± 0.66	20.87 ± 6.34	<0.001
IL-6 (pg/ml)	1.07 ± 0.61	2.32 ± 0.84	0.010

CRP: C-reaktif protein, **IL-6:** İnterlökin 6

Endocan, CRP ve IL-6 parametrelerinin korelasyon analizi sonuçları Tablo 2 de verildi. Endocan ile CRP arasında pozitif yönde, orta düzeyde ve istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon görüldü ($P= 0.002$, $r= 0.595$). Endocan ile IL-6 arasında pozitif yönde, orta düzeyde ve istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon görüldü ($P<0.001$, $r= 0.597$). IL-6 ile CRP arasında pozitif yönde, orta düzeyde ve istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon görüldü ($P= 0.004$, $r= 0.507$) (Tablo 2).

Tablo 2. Endocan, CRP ve IL-6 parametrelerinin Korelasyon analizi sonuçları

	Endocan (ng/L)	CRP (mg/L)	IL-6 (pg/ml)
Endocan (ng/L)	$r=1.000$ -		
CRP (mg/L)	$r=0.595$ $P=0.002$	$r=1.000$ -	
IL-6 (pg/ml)	$r=0.597$ $P<0.001$	$r=0.597$ $P=0.004$	$r=1.000$ -

CRP: C-reaktif protein, **IL-6:** İnterlökin 6

Bu çalışmada Endocan için kesme noktası 15.85 alındığında duyarlılık, özgüllük, ROC AUC ve LR değerleri hesaplandı (sırasıyla; %91, %11, 0.919, 8.18). CRP ve IL-6 değişkenlerine ait duyarlılık, özgüllük, LR ve AUC değerleri Tablo 3'de ifade edildi.

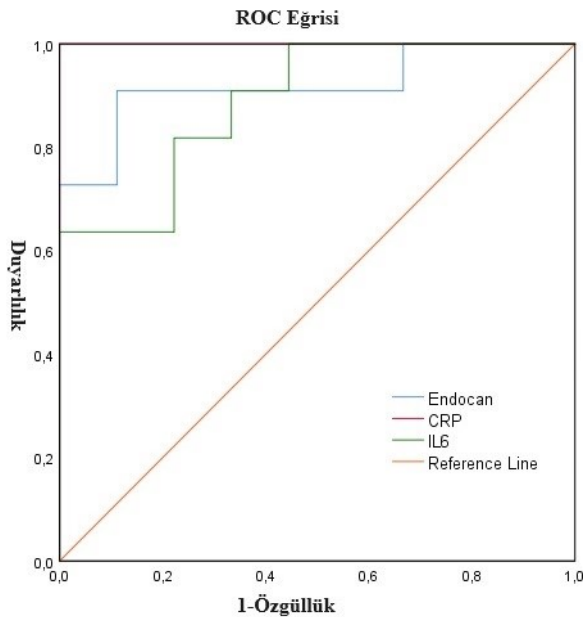
Tartışma ve Sonuç

Akut faz proteinleri (AFP), enfeksiyöz hastalıklarda (Ok ve ark., 2015), immün aracılı hastalıklarda

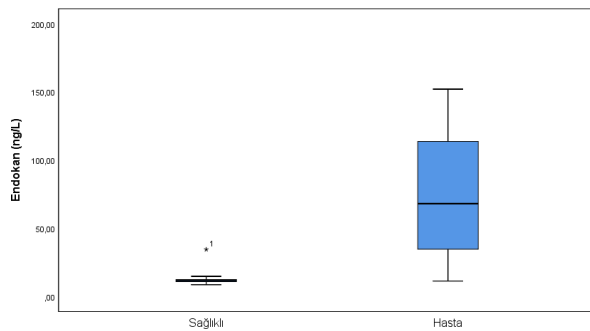
Tablo 3. Endocan, CRP ve IL-6 kesme noktası için duyarlılık, özgüllük, olasılık oranı ve işlem karakteristiği eğrisi (ROC) altındaki kalan alan (AUC) değerleri

Değişkenler	Kriter	Duyarlılık	Özgüllük	AUC	LR
Endocan (ng/L)	>15.85	0.909	0.111	0.919	8.18
CRP (mg/L)	>2.94	1.000	0.111	1.000	9.00
IL-6 (pg/ml)	>1.90	0.636	0.111	0.889	5.73

CRP: C-reaktif protein, **IL-6:** İnterlökin 6, **AUC:** Çalışma özellikleri altındaki alan, **LR:** Olasılık oranı



Şekil 1. ROC analizi sonuçları.



Şekil 2. Gruplar arası Endocan konsantrasyonlarının karşılaştırılması.

(Bathen-Noethen ve ark., 2008; Mitchell ve ark., 2009), neoplazilerde (Nielsen ve ark., 2007; Planellas ve ark., 2009; Shida, 2011) klasik inflamasyon belirtilerinden daha hızlı ve daha kısa bir yarı ömür ile tepki verirler. Köpeklerde CRP düzeyleri çeşitli yangısal durumlarda en çok araştırılan AFP'dir. Kan CRP seviyeleri, köpeklerde inflamatuvar bir uyarıdan sonraki ilk 8-24 saat içinde artar ve 48 saat sonra pik noktaya ulaşan değerler 1-2 hafta içinde normal seviyelere döner (Christensen ve ark., 2014; Hindenberg ve ark., 2018). Bu çalışmada kontrol grubundaki köpeklerdeki ortalama CRP düzeylerinin 2.24 ± 0.66 mg/L olduğu, PVE'li köpeklerde ise ortalama 20.87 ± 6.34 mg/L olduğu saptanmıştır. Parvoviral enfeksiyonlu köpeklerde sağlıklı deneklere göre; serum CRP seviyeleri 10 kat daha yüksek olabileceği bildirilmiştir (McClure ve ark., 2013). Kocatürk ve ark. (2010) ölüm oranının %91 oranında görüldüğü parvoviral enteritli köpeklerde 92.4 mg/L'nin üzerindeki CRP seviyelerini rapor etmişlerdir. Sağlıklı köpeklerin CRP

konsantrasyonları genellikle <10 mg/L'dir. Ancak klinik açıdan sağlıklı bazı köpekler biraz daha yüksek değerlere (25 mg/L'ye kadar) sahip olabilir. Bazı çalışmalarda CRP aralığının $\sim 10-20$ mg/l'nin altında olduğu da gösterildi (Hillström ve ark., 2014; Ok ve ark., 2015; Hindenberg ve ark., 2018). Başbuğ ve ark. (2020) ölen ve yaşayan parvoviral enteritli köpeklerin CRP düzeyini kontrol grubuna göre önemli düzeyde yüksek ve CRP eşik değerinin ise 120.50 mg/L olduğunu belirlemiştir. Doku hasarı ve enfeksiyonlarda yüksek CRP seviyesinin zayıf prognozu gösterdiği belirtilse de, kısa yarılanma zamanı ve akut dönemde ortaya çıkması nedeniyle daha çok diagnostik açıdan önemli bir biyobelirteçtir (Kocatürk ve ark., 2010). Çalışmada elde edilen ortalama CRP düzeylerinin diğer çalışmalardan farklı biçimde düşük bulunmasının çalışmalardaki köpeklerin enfeksiyonun farklı (erken veya geç) dönemlerinde olduğunu göstermektedir. Araştırmada önceki çalışmalarla uyumlu olarak hasta grubunda sağlıklılara göre yaklaşık 10 katı CRP konsantrasyonlarının anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür (Kocatürk ve ark., 2010, Başbuğ ve ark., 2020). Ayrıca PVE için CRP analizlerinin özgüllük ve duyarlılığının da oldukça yüksek olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada; yangının ilk aşamasında oluşan ve önemli proinflamatuvar sitokinlerden olan IL-6 düzeylerinin de sağlıklılara oranla önemli oranda yüksek olduğu belirlenmiştir. Savunma sisteminin cevabı olarak yangısal hücrelerden salgılanan bu tür mediatörler karaciğerden akut faz proteinlerinin üretimine yol açarlar. İnsan çalışmalarında daha çok araştırılan bir belirteç olan IL-6 (Declue ve ark., 2012; Miao ve ark., 2013), IL-1 ve TNF- α 'ya ek olarak, erken akut faz reaksiyonunda yer alan üç ana sitokinden biridir. Esas olarak monositler ve makrofajlar tarafından üretilirken, kronik inflamatuvar hastalıkta IL-6'nın ana kaynağı T lenfositlerdir. IL-6 salınımı lipopolisakkaritler, viral enfeksiyonlar veya nekrotik hücreler tarafından salınan ürünler tarafından indüklenir (Naugler ve Karin, 2008). IL-6 kendi başına serum amiloid A (SAA) ve CRP gibi AFP'nin üretimini indükler (Castell ve ark., 1988). Bu çalışmada da IL-6 düzeyleri sağlıklılara oranla hastalarda önemli oranda yüksek bulunmuştur. Ayrıca CRP ve IL-6 arasındaki orta derecede belirlenen pozitif korelasyon yukarıdaki çalışmalarda belirtildiği gibi; IL-6'nın CRP üretimi ile paralel olduğu ve bu sitokinin CRP üretimini indüklediğini desteklemektedir. Parvoviral hastalığın enterik formunda kript epitellerinde nekroz oluşmaktadır. Villus ve lamina propria, kript epitelinin kaybı ve dökülen villöz epitel hücrelerinin yerine konamaması sonucu önemli oranda hasara uğrar. Sindirimin bozulması ve malabsorbsiyon sonucunda oluşan diyare, dehidrasyon, elektrolit dengesizliği, endotoksik şok veya sekonder sepsisemiye yol açabilir (Nandi ve Kumar, 2010). İnsanlarda sistemik inflamatuvar yanıt sendromu ve sepsis veya septik şok gibi yangısal durumlarda endotelial glikokaliks (eGCX) yapının bozulacağı bildirilmiştir (Nelson ve ark., 2008). Endotel-

yal hücreye özgü molekül-1 (ESM-1) veya Endocan, eGCX tabakanın hasarına bağlı olarak kan serumunda düzeylerinin artması nedeniyle sepsis gibi kritik durumlar için umut vadeci bir biyobelirteç olduğu belirtilmektedir (Uchimido ve ark., 2019). Çalışmamızda elde edilen ve kontrol grubuna göre önemli oranda artış gösteren Endocan düzeyleri bu hayvanlarda endotel düzeyinde bir yıkımlanmanın olduğunun göstergesi olarak kabul edilmiştir. Köpeklerde damar endoteli hasarının belirlenmesi için standart bir yöntem olmamakla birlikte parvoviral enfeksiyonlu köpeklerde Endocan düzeylerinin araştırıldığı son bir araştırmada; sağlıklı köpeklere oranla parvoviral enfeksiyonlu köpeklerde daha yüksek ESM-1 (Endocan) seviyelerinin eGCX hasarını gösterebileceğini de belirlemişlerdir (Naseri ve ark., 2020). Ayrıca, parvoviral enfeksiyon nedeniyle hayatta kalamayan köpeklerde serum ESM-1'in yüksek seviyeleri, serum ESM-1'in CPV'li köpeklerde mortaliteyi tahmin etmede faydalı bir biyobelirteç olabileceği de aynı yazarlar tarafından ortaya konulmuştur. Araştırmamızda önceki çalışmalardan farklı olarak hasta grubundaki köpeklerde CRP, IL-6 bulguları ile birlikte Endocan analizleri birlikte değerlendirildi. Sonuçta yangı öncesi sitokin (IL-6) ve ilgili akut faz proteini (CRP) bulgularının ortalama Endocan bulguları ile sağlıklılara göre artış tarzında paralel seyretmesi (Tablo 1) nedeniyle Endocan'ın CPE için de CRP'ye benzer biçimde önemli bir biyobelirteç aday olduğunu göstermektedir. Yapılan pearson korelasyon analizlerinde de bu üç parametre arasında orta düzeyde pozitif korelasyonların belirlenmesi (Tablo 2) nedeniyle korelasyon sonuçları da yukarıdaki yargıyı desteklemektedir. Bu çalışmada aynı zamanda Parvoviral enteritlerde Endocan düzeylerinin eşik değerleri, spesifite ve sensitivite de ortaya konulmuştur (Tablo 3). Elde edilen sonuçlar bu alanda yapılan son çalışma olan Naseri ve ark., (2020)'nin çalışmasında elde edilen sonuçlardan farklı olarak belirlenmiştir. Önceki araştırmada, 0.821'lik AUC, %100'lük bir duyarlılık ve %67'lik bir özgüllük Endocan için ortaya konulmuştu. Bu çalışmada ise; Endocan için kesme noktası 15.85 ng/L alındığında duyarlılık, özgüllük, ROC AUC ve LR değerleri sırasıyla; %91, %11, 0.919, 8.18 olduğu belirlenmiştir. Bu değerlerin yukarıdaki verilerle karşılaştırıldığında sağlıklı gruba göre hasta köpeklerde Endocan seviyelerinin önemli düzeyde artması nedeniyle belirli bir oranda endotelial hasarını desteklemiştir. Ancak Naseri ve ark.'nın (2020) yaptıkları son çalışmadaki hem sağlıklı hem de çalışma grubundaki köpekler ile kıyaslandığında bu tez çalışmasının bulgularının Endocan aktivitesi yönünden daha düşük düzeyde olduğu görülmüştür. Bu farklılığın temel nedenleri arasında; öncelikli olguların farklılığı, kullanılan ELISA kitlerinin farklılığı, kitlerin farklı duyarlılık ve standart konsantrasyonlarında olması, ve son olarak her iki çalışma da kullanılan hayvanların ve örneklemenin alındığı andaki enfeksiyon düzeylerinin veya günlerinin farklı olması, bu çok hassas analizin çalış-

malar arasında farklı düzeylerde seyredebileceğini düşündürmüştür. Fakat her iki çalışmanın kendi kontrol grupları ve spesifik laboratuvar şartları ile değerlendirilmesi her bir çalışmanın özgünlüğünü ortaya koymaktadır.

Sonuçta; parvoviral enfeksiyonda yangısal durumu belirleyen ve küçük hayvan hekimliği alanındaki güncel teşhis parametrelerinden Endocan, IL-6 ve CRP seviyelerindeki pozitif korelasyonlar nedeniyle bu üç parametrenin de parvoviral enfeksiyonlarda yangısal sürecin değerlendirilmesinde etkin faktörler olduğu belirlenmiştir. Yukarıdaki sonuçlara rağmen bu çalışmayı sınırlayan bazı faktörler de söz konusudur. Bunlar; Örneklerin ELISA sürecinde çift olarak çalışılmasına rağmen, kontrol ve çalışma grubundaki her bir köpekten bir kez kan örneğinin alınması, sağ kalan ve ölen köpekler arasında parametreler arasında farklılığın belirlenememesi, çalışma grubu köpeklerinde sepsis, SIRS kriterlerinin kesin biçimde belirlenememesi nedeniyle sepsis için yukarıdaki parametrelerin tam olarak geçerliliğinin kanıtlanamaması, ölen köpeklerde histopatolojik analizlerin yapılmaması gibi eksiklikler sayılabilir. Sunulan çalışma ESM1/Endocan üzerine küçük hayvan çalışmaları içerisinde alanında ikinci çalışmadır. Dolayısıyla bu alanda halen kontrollü, farklı hastalıklarda, sepsis kriterlerinin doğrulandığı, hastalık süresince Endocan takiplerinin yapıldığı, damar endotel hasarının immünohistokimyasal yöntemlerle ve kan bulguları ile saptandığı daha ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Teşekkür

TYL-2021-9233 kodlu proje ile bu tez çalışmasının yapılmasındaki katkılarından dolayı Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Başbuğ O, Yurdakul I, Yüksel M. Evaluation of serum amyloid A and procalcitonin in some inflammatory diseases of cattle. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2020; 26(3): 397-402.
- Bathen-Noethen A, Carlson R, Menzel D, Mischke R, Tipold A. Concentrations of acute-phase proteins in dogs with steroid responsive meningitis-arteritis. *J Vet Intern Med* 2008; 22(5): 1149-56.
- Büyüktiryaki M, Okur N, Tayman C, Serkant U, Çakır U, Halil H, Öncel MY, Oğuz SŞ. Endocan geç neonatalsepsisi öngörebiliyor mu? Yirmi Beşinci Ulusal Neonatoloji Kongresi (UNEKO 25), Nisan, 24-28, 2017, Antalya; Türkiye.
- Castell JV, Gómez-Lechón MJ, David M, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC. Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocy-

- tes. FEBS Lett 1988; 232(2): 347-50.
- Charoenkul K, Janetanakit T, Chaiyawong S, Bunpa-pong N, Boonyapisitsopa S, Tangwangvivat R, Amonsin A. First detection and genetic characterization of canine Kobuvirus in domestic dogs in Thailand. BMC Vet Res 2019; 15(1): 254.
- Christensen MB, Langhorn R, Goddard A, Andreasen EB, Moldal E, Tvarijonaviciute A, Kirpensteijn J, Jakobsen S, Persson F, Kjølgaard-Hansen M. Comparison of serum amyloid A and C-reactive protein as diagnostic markers of systemic inflammation in dogs. Can Vet J 2014; 55(2): 161-8.
- DeClue AE, Sharp CR, Harmon M. Plasma inflammatory mediator concentrations at ICU admission in dogs with naturally developing sepsis. J Vet Intern Med 2012; 26(3): 624-30.
- Ford J, McEndaffer L, Renshaw R, Molesan A, Kelly K. Parvovirus infection is associated with myocarditis and myocardial fibrosis in young dogs. Vet Pathol 2017; 54(6): 964-71.
- Goddard A, Leisewitz A. Canine Parvovirus. Vet Clin NA Small Anim Pract. 2010; 40: 1041-53.
- Hillström A, Hagman R, Tvedten H, Kjølgaard-Hansen M. Validation of a commercially available automated canine-specific immunoturbidimetric method for measuring canine C-reactive protein. Vet Clin Pathol 2014; 43(2): 235-43.
- Hindenberg S, Keßler M, Zielinsky S, Langenstein J, Moritz A, Bauer N. Evaluation of a novel quantitative canine species-specific point-of-care assay for C-reactive protein. BMC Vet Res 2018; 14: 99.
- Hsu T, Nguyen-Tran HH, Trojanowska M. Active roles of dysfunctional vascular endothelium in fibrosis and cancer. J Biomed Sci 2019; 26: 86.
- Kocaturk M, Martinez S, Eralp O, Tvarijonaviciute A, Cero J, Yılmaz Z. Prognostic value of serum acute-phase proteins in dogs with parvoviral enteritis. J Small Anim Pract 2010; 51: 478-83.
- Lamm CG, Rezabek GB. Parvovirus infection in domestic companion animals. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2008; 38(4): 837-50.
- Mazzaferro EM. Update on Canine Parvoviral Enteritis. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2020; 50(6): 1307-25.
- McClure V, van Schoor M, Thompson PN, Kjølgaard-Hansen M, Goddard A. Evaluation of the use of serum C-reactive protein concentration to predict outcome in puppies infected with canine parvovirus. J Am Vet Med Assoc 2013; 243(3): 361-6.
- Miao LH, Song Q, Liu H, Pan L, Zhou FH. Clinical study of prognostic value of interleukin-6 in severe acute pancreatitis. Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue 2013; 25(4): 238-41.
- Mitchell KD, Kruth SA, Wood RD, Jefferson B. Serum acute phase protein concentrations in dogs with autoimmune hemolytic anemia. J Vet Intern Med 2009; 23(3): 585-91.
- Nandi S, Kumar M. Canine parvovirus: current perspective. Indian J Virol 2010; 21(1): 31-44.
- Naseri A, Gulersoy E, Ider M, Durgut MK, Erturk A, Avci C, Koral E, Sevinc M, Ok M. Serum biomarkers of endothelial glycocalyx injury in canine parvoviral infection. Austral J Vet Sci 2020 52(3): 52.
- Naugler WE, Karin M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. Trends Mol Med 2008; 14(3): 109-19.
- Nelson A, Berkestedt I, Schmidtchen A, Ljunggren L, Bodelsson M. Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: relation to mortality and the antibacterial actions of plasma. Shock 2008; 30(6): 623-7.
- Nielsen L, Toft N, Eckersall PD, Mellor DJ, Morris JS. Serum C-reactive protein concentration as an indicator of remission status in dogs with multicentric lymphoma. J Vet Intern Med 2007; 21(6): 1231-6.
- Ok M, Er C, Yıldız R. Evaluation of acute phase proteins and cytokines in dogs with parvoviral enteritis. Eurasian J Vet Sci 2015; 31(3): 143-7.
- Planellas M, Bassols A, Siracusa C, Saco Y, Giménez M, Pato R, Pastor J. Evaluation of serum haptoglobin and C-reactive protein in dogs with mammary tumors. Vet Clin Pathol 2009; 38(3): 348-52.
- Polat PF, Şahan A, Aksoy G, Timurkan MO, Dinçer E. Molecular and restriction fragment length polymorphism analysis of canine parvovirus 2 (CPV-2) in dogs in southeast Anatolia, Turkey. OJVR 2019; 86(1): 1-8.
- Prittie J. Canine parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention. J Vet Emerg Crit Care 2004; 14: 167-76.
- Rallis TS, Papazoglou LG, Adamama-Moraitou KK, Prassinou NN. Acute enteritis or gastroenteritis in young dogs as a predisposing factor for intestinal intussusception: A retrospective study. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med 2000; 47(8): 507-11.
- Shida T. Characteristics of C-reactive protein (CRP), a1-acid glycoprotein (AAG) and serum amyloid A (SAA) in dogs and cats with malignant Cancer.

Intern J Appl Res Vet Med 2011; 9: 376-81.

Uchimido R, Schmidt EP, Shapiro NI. The glycocalyx: a novel diagnostic and therapeutic target in sepsis. Crit Care 2019; 23(1): 16.