

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**KÖPEKLERDE VON WILLEBRAND HASTALIĞININ KLİNİK VE
GENETİK YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ**

Proje No:

TSA-2013-4375

Proje Türü

Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Doç.Dr. Öznur ASLAN

ERÜ Veteriner Fakültesi Klinik Bilimler Bölümü

Araştırmacı: Yrd. Doç. Dr. Korhan ARSLAN

ERÜ Veteriner Fakültesi Zootekni ve Hayvan Besleme Bölümü

Araştırmacı: Prof. Dr. İhsan KELEŞ

ERÜ Veteriner Fakültesi Klinik Bilimler Bölümü

Araştırmacı: Doç. Dr. Bilal AKYÜZ

ERÜ Veteriner Fakültesi Zootekni ve Hayvan Besleme Bölümü

Araştırmacı: Araş. Gör. Mehmet ULUSAN

ERÜ Veteriner Fakültesi Klinik Bilimler Bölümü

Araştırmacı: Araş. Gör. Gamze Esma İLGAR

ERÜ Veteriner Fakültesi Zootekni ve Hayvan Besleme Bölümü

Mart 2016

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Çalışmamızı TSA-2013-4375 proje kodu ile destekleyen ERÜ Bilimsel Araştırmalar Projeler birimine teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	5
ABSTRACT.....	5
GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM.....	6
GENEL BİLGİLER.....	7
GEREÇ VE YÖNTEM.....	9
BULGULAR.....	10
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	14
KAYNAKLAR.....	17

Köpeklerde von Willebrand faktör antijen seviyesi ve von Willebrand faktör geni arasındaki ilişkinin belirlenmesi

ÖZET

Bu çalışmada, köpeklerde von Willebrand faktör geninin 42. ekzonunun 2380. pozisyonunda meydana gelen lösin (L) - prolin (P)'nin yer değiştirmesine neden olan mutasyon sonucu oluşan polimorfizm ile plazma vWF antijen seviyeleri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlandı.

Çalışmaya, Ocak 2014 ve 2015 yılları arasında, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Kliniklerine getirilen farklı ırk ve yaşta (95 erkek, 66 dişi) 161 köpek dahil edildi. Köpeklerin klinik muayeneleri yapılarak EDTA ve Na sitratlı tüplere kan örnekleri toplandı. Kan örneklerinde PT, APTT, TT, fibrinojen, D-dimer, trombosit, vWF antijen (vWF: Ag) seviyeleri belirlendi ve VWF elde edildi. Genotipler, yapılan PCR sonucunda elde edilen ürünlerin *MspI* endonükleaz enzimi ile kesilerek belirlendi. Laboratuvar muayenesinde 34 köpek (% 21.1) von Willebrand açısından pozitif olarak belirlenirken, 127 köpeğin (%78.9) negatif olduğu belirlendi. Çalışmaya dahil edilen hayvanlarda ırklara göre hastalığın görülme oranları Golden Retriever (n=35) %34.3, Kangal (n=45) %11.1, German Shepherd (n=11) (%36.4), Labrador Retriever (n=7) %42.9, English Cocker Spaniel (n=2) %100, English Pointer (n=8) %25.0, mix breed (n=8) %33.3, Husky (n=7) %12.5, Malinois (n=1) %100, Dogo Argentino (n=2) %50.0, Samoyed (n=1) %100 ve diğer ırklar %0 olarak belirlendi. Hem pozitif hem de negatif köpeklerde VWF genotipi ile vWF: Ag değerleri arasında istatistiksel olarak bir ilişkili bulunamadı (P=0.675). vWD pozitif ve negatif köpeklerde oransal dağılım açısından karşılaştırıldığında hastalık oranı ve genotip arasında istatistik bir önem gözlenmedi (P=0.969). Sonuç olarak, köpeklerde vWF antijen seviyesi ve VWF arasında ilişki bulunmadı. Bilgilerimize göre bu çalışma, VWF and vWF: Ag arasındaki ilişkinin araştırıldığı ilk çalışma olması nedeniyle önemlidir.

Anahtar kelimeler: pıhtılaşma, köpek, hemostaz, mutasyon, von Willebrand faktör

The relationship between von Willebrand factor gene and von Willebrand factor antigen levels in dogs

ABSTRACT

In this study, the relationship between plasma vWF antigen level and polymorphism occurring due to the leucine (L) to proline (P) substitution at position 2380 in exon 42 in von Willebrand factor gene (VWF) in dogs was aimed to investigate.

The present study was performed on 161 dogs of various breeds and ages (95 male, 66 female) referred to Faculty of Veterinary Clinics at Erciyes University between January 2014 and 2015. Blood samples were collected in EDTA and Na citrate tubes after clinical examination of the

dogs. PT, APTT, TT, fibrinogen, D-dimer, thrombocyte, vWF antigen (vWF: Ag) levels and VWF were determined from the blood samples. Genotypes were examined using PCR and restriction endonucleas enzymes. In the laboratory examination, 34 (21.1%) of the cases were positive and 127 (78.9%) of the cases were negative with concern to von Willebrand. Prevalence of the disease in different dog breeds that included to the present study were Golden Retriever (n=35) 34.3%, Kangal (n=45) 11.1%, German Shepherd (n=11) (36.4%), Labrador Retriever (n=7) 42.9%, English Cocker Spaniel (n=2) 100%, English Pointer (n=8) 25.0 %, mix breed (n=8) 33.3 %, Husky (n=7) 12.5%, Malinois (n=1) 100%, Dogo Argentino (n=2) 50.0%, Samoyed (n=1) 100% and some other breeds were 0%. The genotype of VWF was not statistically significant in both positive and negative dogs with concern to vWF: Ag values (P=0.675). When comparison were made in terms of proportional distribution in positive and negative dogs, statistical importance were not observed between genotype and the disease ratio (P=0.969).

In conclusion, relationship between VWF and vWF antigen level were not determined in dogs. According to our knowledge; this study is the first repot on VWF and vWF: Ag relationship therefore believed to be important.

Keywords: *coagulation, dog, haemostasis, mutation, von Willebrand factor*

GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Kanama bozukluğu ile seyreden hastalıklar köpeklerde önemli klinik sonuçlar doğurma riski taşıyan ve kalıtsal olarak aktarılma özelliği olan sendromların da dahil olduğu bir hastalık grubudur. von Willebrand sendromu, köpeklerde otozomal resesif olarak aktarılan kanama bozukluğu ile seyreden hastalıklar grubunda yer alan kalıtsal genetik bir hastalıktır. von Willebrand faktör (vWF) normal trombosit adhezyonu için gerekli olup, trombosit fonksiyon defektinden şüphe edildiğinde vWF ölçülür. Kalıtsal vWF yetersizliği özellikle bazı köpek ırklarında yaygındır. Bu nedenle, bu faktörün yetersizliğinin kalıtsal olarak bulunduğu olan köpek ırklarında cerrahi müdahale öncesi veya damızlıkta kullanılan köpeklerde vWF'nün ölçülmesi gerekmektedir.

Yapılan proje ile köpeklerde kanama bozukluğu ile karakterize olduğu bildirilen ve aynı zamanda kalıtsal bir hastalık olan von Willebrand hastalığının klinik, laboratuvar ve genetik yönden profilinin ortaya konması amaçlandı. Bu amaçla köpeklerde plazma vWF faktör antijen miktarı, klinik bulgular, kan pıhtılaşma parametreleri ve ilgili genin allel frekansı arasındaki ilişki değerlendirildi. Ülkemizde, köpeklerde von Willebrand hastalığının klinik ve genetik teşhisine yönelik yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Sonuç olarak; köpeklerde VWF'ninde ekzon 42'nin 2380 pozisyonunda *MspI* polimorfizmi ve plazma vWF: Ag seviyesi arasında ilişki belirlenmedi. Sunulan çalışmada köpeklerde VWF'ninde ekzon 42'nin 2380 pozisyonunda *MspI* polimorfizmi belirlenmesinin vWD'nin kesin tanısı için yetersiz olduğu düşünüldü. Bilgilerimize göre VWF ve vWF: Ag arasında ilişkinin bildirildiği ilk çalışma olması nedeniyle literatüre katkı sağlayacağını düşünüldü. Ayrıca çalışmanın diğer bir önemi klinik sendromlar ve klinik ilişkisinin belirlendiği nadir çalışmalardan biri olmasıdır. Bunun yanı sıra vWD hastalığı ve vWF: Ag seviyeleri kangal ırkı köpeklerde ilk kez bildirilmiştir.

GENEL BİLGİLER

Kanama problemleri, acil önlem gerektiren problemlerdendir. Şiddetli klinik problemler (epistaksis vb.), ırk özelliği (doberman pinscher ırkı köpekler vb.) veya laboratuvar bulgularındaki değişimler (trombosit sayısında azalma, hepatik hastalıklar nedeniyle) gibi pek çok nedenle karşımıza çıkabilir (1). Örneğin burun kanamalı bir hasta geldiğinde kanamanın lokal sebeplerden mi ileri geldiği, kanama eğilimi mi yoksa her ikisinden mi kaynaklandığının belirlenmesi önemlidir. Lokal sebeplerle olduğuna karar verilmesi çoğunlukla kanama eğiliminin göz ardı edilmesine neden olur. Bunun sonucu özellikle cerrahi müdahaleler sırasında şiddetli kanamaların meydana gelmesi gibi istenmeyen sonuçlar sebep olabilir (2).

Anormal kanama nedenleri; vasküler defektler, trombositopeni, trombosit fonksiyonunda anormallik, koagülasyon faktörlerinde defektler ve aşırı fibrinolitik aktiviteler olarak sıralanabilir (1). Hemostazis kompleks fizyolojiye sahiptir. Hemostazis primer ve sekonder hemostasis olarak ikiye ayrılabilir. Vasküler endotelium, plateletler ve vWF primer hemostazis ya da stabil olmayan platelet plağının oluşumu için gerekli yapılardır. Sekonder hemostazis olarak bilinen stabil fibrin pıhtısı daha geniş damar yaralanmaları için gereklidir (3).

Hemostatik defekt genel olarak 4 mekanizma içinde değerlendirilmelidir. Bunlar; kan damarları, trombositler, koagülasyon faktörleri ve fibrinolitik sistemdir.

Klinik semptomlar ve fiziksel muayene bulguları defektin lokalizasyonunu belirleyen testlerden çok daha az spesifiktir. Ancak, başlangıçta hemostatik defektin trombositlerden mi, yoksa koagülasyon probleminden mi kaynaklandığını gösterir. Peteşi ya da ekimoz gibi küçük hemorajiler trombosit defektinin belirtisi olabilir.

Koagülasyon defektleri daha geniş hematoma ve eklem içi kanamalar gibi hemorajilerle karakterizedir. Koagülopatilerde trombosit plağı oluşur, ancak bu fibrin yumaklarıyla stabilize edilemediğinden yıkımlanmaya uğrar ve kanamayla sonuçlanır (1).

Kanama profilini belirlemek için trombosit sayısı için trombosit sayımı, trombosit fonksiyonu için kanama zamanı, intrinsik ve yaygın sistem için APTT, ekstrinsik sistem için PT, pıhtı

oluşumu ve yıkımlanma oranının değerlendirilmesi için fibrin yıkımlanma ürünlerinin (FDP), von Willebrand hastalığının tanısı için vWF:Ag gibi hemostatik profil testlerinin yapılması gerekmektedir (1-4). vWF'ün plazma konsantrasyonu yangı sırasında akut faz bir reaksiyon olarak artar. Köpeklerde karaciğer hastalıklarında, doğum sırasında, endotokseminde ve epinefrin infüzyonunu takiben plazma konsantrasyonu artmaktadır. vWF genellikle rocket elektro immüno diffüzyon veya ELISA ile ölçülür (1).

Kalıtsal koagülasyon faktör yetersizliği açıklanamayan hemorajiler olduğunda veya şırıjikal müdahaleden sonra hemoraji devam ettiğinde düşünülür. Koagülasyon defekti, defektin özelliğine göre değişen önemli klinik hemoraji ile sonuçlanır (5).

von Willebrand hastalığı köpeklerin en yaygın kalıtsal, otozomal kalıtım profiline sahip kanama hastalığıdır; potansiyel olarak herhangi bir ırkta görülebilir (5,6). von Willebrand faktör primer hemostaz da önemli rol oynayan multimerik bir plazma glikoproteindir (7). von Willebrand faktör endotel hücreleri tarafından üretilmekte olup az da olsa platelet veziküllerinde de depo edilir. Görevi vasküler hasar esnasında plateletlerle damar duvar subendotelyumu arasında bir moleküler köprü işlevi görmektir. Bunun yanında vWF'nin diğer tanımlanmış fonksiyonu da koagülasyon faktörü VIII'nin (FVIII) plazmada bulunma istikrarını sağlamaktır (8).

vWF geni 178 kilo baz büyüklüğünde; köpek karyotipinde 12 numaralı kromozomun üzerinde yer alan çok tekrarlı bölgeleri içeren bir gendir (9). VWF sendromunun kalıtsal varlığı ile ilgili tespit edilmiş iki yaygın mutasyon bulunmaktadır. Bu mutasyonların biri genin 4 numaralı ekzonun da diğeri ise 42 numaralı ekzonunda bulunan mutasyonlardır (10).

vWF sendromu üç tip olarak sınıflandırılmaktadır. Tip I Doberman pincher, pembroke Welsh Corgis, Bernese mountaiondog gibi köpek ırklarında çok yaygın bir şekilde görülmektedir. Bu tipte vWF seviyesi normalden %15 daha az olup yapısı normaldir. Bu tür köpekler travma ya da cerrahi bir müdahalelerde kanama riski fazla olduğu için transfüzyon desteğine ihtiyaç duyacaklardır. Tedavisinde kullanılan Desmopressin von Willebrand faktörün depolardan salınımını ve dolayısıyla plasma miktarını arttırmaktadır (5,11). Ancak her köpek desmopressine cevap verememektedir. Tip II'de ise vWF hem seviyesi azdır hem de yapısı bozulmuştur. German Wirehaired ve Short haired pointer ırkı köpeklerde sıklıkla rastlanmaktadır. Tip II daha şiddetli seyretmektedir. Tip III en şiddetli seyreden formudur. Bu köpeklerde vWF hiç sentezlenmez. Shetland sheep dog ve Scottish terrier köpek ırklarında Tip III formunun olduğu bilinmektedir. Kanama cerrahi müdahalelerde ortaya çıkabildiği gibi epistaksis ve gingival kanamalar gibi spontan olarak da gelişmektedir.

vWF hastalığında klinik semptom genel olarak burun delikleri ve gingiva gibi mukozal yüzeylerde meydana gelen kanamalardır. Bu hastalar cerrahi ve travmalı olaylarda morarma ve

kanamalara sahiptir (5). Kanın pıhtılaşmasında vWF önemli olmasına rağmen, her zaman ölümcül olmayabilir ve köpekler yıllarca hayatlarına teşhis edilmeden devam edebilirler (6).

Tedavide taze tam kan, taze dondurulmuş plazma ve krioprecipitate gibi ürünler tavsiye edilmektedir (5).

Von Willebrand's hastalığı insan ve köpeklerde kazanılmış ve inheriter olarak seyreden en yaygın kanama hastalığıdır (6, 12, 13).

Willebrand's hastalığı köpeklerin en yaygın kalıtsal hemostatik hastalığıdır ve köpeklerde otozomal resesif bir karakter olarak aktarılmaktadır (5). Willebrand's hastalığı ya von Willebrand's faktörün miktar olarak yetersiliği ya da yapısal bozukluğu ya da her ikisinin aynı anda varlığı nedeniyle oluşur (6,12,13). Hastalık vWF multimer yapısı ve plazma konsantrasyonuna göre fenotipik olarak tip I, II ve III olarak klasifiye edilmektedir (12, 13). Plazma vWF antijen (vWF: Ag) konsantrasyonunun ölçülmesi hastalığın tanısı için altın standart olarak kabul edilmekte ve bu yöntemle taşıyıcılar belirlenebilmektedir (13). vWF: Ag konsantrasyonuna göre >%70 olan hayvanlar negative ve <%50 olan köpekler vWD pozitif olarak değerlendirilmektedir (13,14). Köpek ve insan Willebrand faktör gen (*VWF*) nükleotid sekansları %85 identik olması nedeniyle köpeklerde kros-tür modellemesi yapılabilmektedir. İnsanda *VWF* DNA'nın 180kb tarandığında 52. Ekzonda, 12. Kromozomun kısa telomerine yakın olarak bulunmuştur (6).

Köpeklerde *VWF* 178 kb boyutundadır ve 12 numaralı kromozomda çoklu tekrarlayan yapıda bulunmuştur (9). Köpeklerde von Willebrand sendromu ile ilgili iki yaygın mutasyon bildirilmiştir. Bunlar 4 numaralı ekzonda ve diğeri ise 42 numaralı ekzondadır (15).

Venta ve Vidal (16) *MspI* sınırlayıcı enzim kullanarak köpek *VWF* 'ninde polimorfizm bildirmişlerdir. Bu polimorfizm köpek *VWF*'ninde 42. ekzonda 2380. Pozisyonda lösin yerine prolin geçişi ile oluşmaktadır (16).

Yapılan çalışma ile köpeklerde *VWF*'ninde ekzon 42'nin 2380 pozisyonunda *MspI* polimorfizmi ve plazma vWF: Ag seviyesi arasında ilişki belirlenmesi amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada hayvan materyali olarak ocak 2014 ve 2015 yılları arasında ERÜ Veteriner Fakültesi Kliniklerine getirilen aşılansız, östrus siklusunda olmayan, hipotroidizm belirtileri göstermeyen farklı ırk ve yaşlarda (95 erkek, 66 dişi) 161 köpek dahil edilmiştir. Klinik muayeneleri yapılan köpeklerden EDTA ve Na sitratlı tüplere kan örnekleri alındıktan sonra oda ısısında 1500 x g'de 15 dk santrifüj edilerek plazma örnekleri ayrıldı. Kan sayımları yapıldı (Mindray BC-2800 Vet[®], China), bütün plazma ve kan örnekleri ölçümler yapılana kadar -80°C saklandı.

Von Willebrand's faktör antijen seviyeleri Siemens Healthcare Diagnostics kitleri kullanılarak CS-5100 analizör (Sysmex UK Ltd, Milton Keynes, UK) kullanılarak belirlendi. Prothrombin time (PT), Activated thromboplastin time (APTT), thrombin time (TT), fibrinogen, D-dimer analizleri Sysmex CA-7000 (Siemens Healthcare Diagnostics) cihazı ile Erciyes Üniversitesi merkez laboratuvarında yapıldı.

Çalışmada kullanılan DNA'lar fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi ile leukositler kullanılarak izole edildi. Kurulan PCR reaksiyonunda 50 ng genomik DNA, 1 X PCR buffer, 1 U Taq polimeraz, 50 µM dNTP Mix ve 0.2'şer µM forward ve revers primer ilave edilerek toplam son hacim 25 µl olacak şekilde PCR karışımı hazırlandı.

VWF geninin PCR reaksiyonu için primer 1 5'- TCTTGTCCCCCGCACTGGA -3'; primer 2 5'- TGGTTGTGGTGCAGCCACAGTC -3' kullanılmıştır. Çalışmada Venta and Vidal (16) bildirdiği, Genbank accession numaralı L76227, U66246, AF099154 köpek VWF gen sekansına uygun dizayn edilen primer seti kullanıldı.

PCR işlemi her bir döngüsü; 94°C'de 30 saniye, 62°C'de 1 dakika, 72°C'de 1 dakika olacak şekilde 50 döngü olarak yapıldı. Sonraki basamakta PCR ürünleri 10U *MspI* restriksiyon endonükleaz (MBI Fermentase®, Lithuania) enzimi ile 60 dakika 37°C de kesim işlemine tabi tutuldu.

Popülasyonda Hardy-Weinberg eşitliği olup olmadığı Chi-Square Test (χ^2) kullanılarak belirlendi. Genetik veriler ile vWD prevalansı Chi-Square Test kullanılarak karşılaştırıldı (MINİTAB 16 software).

Çalışmanın protokolü Erciyes Üniversitesi hayvan deneyleri yerel etik kurulu tarafından onaylandı (Karar no: 2013/09).

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen köpeklerden 95(%59)'i erkek ve 66(%41)'sı dişi idi. Cinsiyet ve yaş ile vWF: Ag konsantrasyonları açısından fark önemli bulunmadı ($P>0.05$). 161 hayvanın 75 (% 46.6) 1 yaşından küçük ve 86 (%53.4) ise 1 yaşından büyüktü. vWF: Ag seviyesinde yaşın etkisi olmadığı belirlendi ($P>0.05$). vWF: Ag konsantrasyonu %50'den yüksek olanlar (127, %78.9) negatif olarak kabul edilirken, vWF: Ag seviyesi %50 'den küçük olanlar (34, %21.1) vWD pozitif olarak kabul edildi (13). vWF: Ag konsantrasyonuna göre pozitif belirlenen ırklar, VWF allel frekansı ve vWD prevalansı tablo I'de verildi.

PCR amplifikasyonunda 147 bp ürün oluştu. PCR ürünleri 10U of *MspI* restriction endonuclease ile parçalandı. 147 bp PCR ürünlerinin *MspI* ile sınırlı parçalanması sonucunda 3 genotip oluştu (Fig. 1) ve LL (+/+) (147 bp), LP (+/-) (147 ve 124 bp) ve PP (-/-) (124 ve 23 bp) olarak

belirlendi.

Table I. The allele frequencies and prevalence the *VWF* in vWD positive dog breeds according to vWF: Ag concentration.

Tablo I. vWF: Ag seviyelerine göre vWD pozitif olan köpek ırklarının *VWF* genotip frekansları ve vWD görülme oranları

Breed	N		Genotypes		
	vWD negative	vWD positive	LL	LP	PP
Golden Retriever	23 (65.7%)	12 (34.3%)	5	6	1
Kangal	40 (88.9%)	5 (11.1%)	4	1	0
German Shepherd	7 (63.6%)	4 (36.4%)	1	1	2
Labrador Retriever	4 (57.1%)	3 (42.9%)	1	1	1
English Cocker Spaniel	0 (0%)	2 (100%)	1	0	1
English Pointer	6 (75.0%)	2 (25.0%)	1	1	0
Mixed breed	4 (66.7%)	2 (33.3%)	1	0	1
Husky	7 (87.5%)	1 (12.5%)	0	1	0
Malinois	0 (0%)	1 (100%)	1	0	0
Dogo Argentino	1 (50.0%)	1 (50.0%)	0	0	1
Samoyed	0 (0%)	1 (100%)	0	0	1
Other Breeds	35 (100%)	0 (0%)			

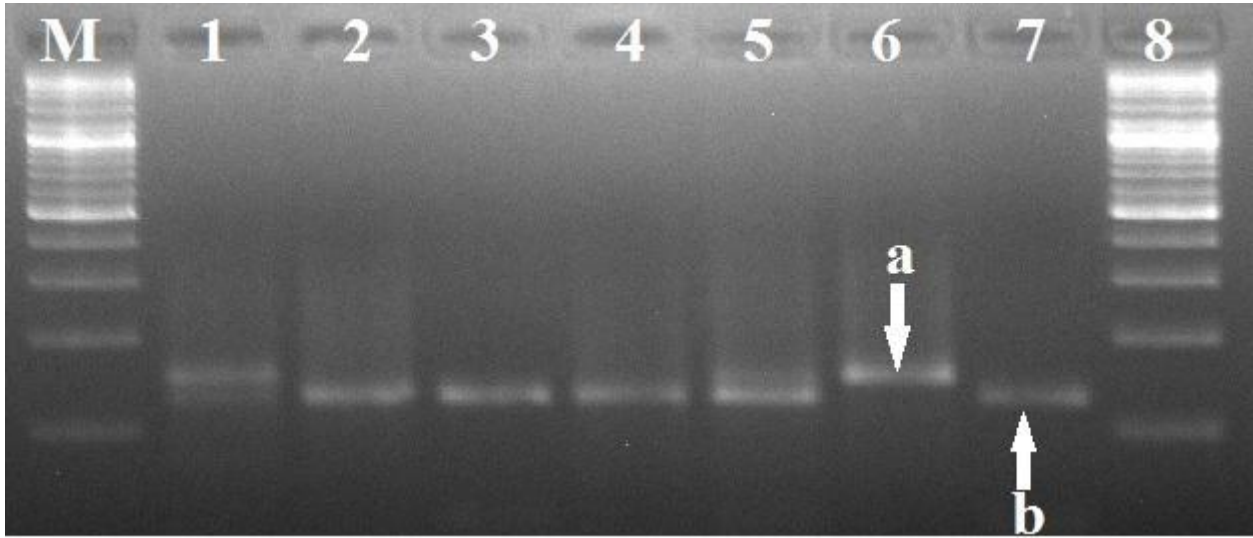


Figure I. Electrophoresis of RFLP of canine *VWF* gene after digestion by *MspI*. Lanes 2-4 and 7; PP (-/-) genotypes; Lanes 1 and 5: LP(+/-) genotypes; lane 6: LL(+/+) genotype; lanes M: DNA ladder (100 bp); a: 147 bp and b: 124 bp.

Şekil I; Köpek *VWF* geninin *MspI* enzim kesim ürünlerinin elektroforez görüntüsü. Hat 2-5 and 7: PP (-/-) genotipli bireyler; Hat 1 ve 5: LP(+/-) genotipli bireyler; Hat 6: LL(+/+) genotipli birey. Hat M: 100 bç'lik DNA merdiveni; a: 147 bç ve b: 124 bç.

Köpeklerde *VWF*'nin heterozigotluk ve allelik durumu ile genotipik frekansı ve polimorfizimleri tablo II'de verildi.

Table II. The allele, genotype frequencies and chi-square analysis of the *VWF*

Tablo II. *VWF*'nin allel, genotip frekansları ve ki kare analizi.

Groups	Genotypes Frequency (%)			Allele Frequency (%)		Statistical Significant (Chi-squared HWE)
	LL	LP	PP	L	P	
N	53 (41.73%)	43 (33.86%)	31 (24.41%)	58.7	41.3	$X^2 = 11.57$ P<0.001 (df=1)
<i>VWF</i>	15 (44.12%)	11 (32.35%)	8 (23.53%)	60.3	39.7	$X^2 = 3.576$ P=0.059 (df=1)

HWE: Hardy-Weinberg Equilibrium; X^2 : Chi-Square value; df: Degree of freedom

vWD pozitif ve vWD negatif köpeklerde *VWF* genotipleri ve vWF: Ag seviyeleri arasında fark bulunmadı (P=0.675) (Table III).

Table III. The proportional distributions of vWF: Ag concentration according to genotypes.

Tablo III. Genotipe göre vWF: Ag konsantrasyonunun oransal dağılımı

Genotype	N	Mean $\pm$ SEM	Statistical Significance (ANOVA)
LL	68	66.16 $\pm$ 2.51	F: 0.394 P=0.675
LP	54	68.67 $\pm$ 2.95	
PP	39	70.10 $\pm$ 4.61	

Ayrıca, vWD pozitif ve vWD negatif köpeklerde VWF'nin genotiplerine göre oransal dağılım karşılaştırıldığında, vWD ve genotip arasında prevalans açısından istatistik önem gözlenmedi (P=0.969) (Table IV).

Table IV. The proportional distributions according to genotypes of the VWF in vWD positive and vWD negative dogs.

Tablo IV. vWD pozitif ve negatif köpeklerde VWF'nin genotipine göre oransal dağılımı

			vWF: Ag		Total
			-	+	
RFLP Result	LL	Count	53	15	68
		%	77.9%	22.1%	100.0%
	LP	Count	43	11	54
		%	79.6%	20.4%	100.0%
	PP	Count	31	8	39
		%	79.5%	20.5%	100.0%
Total		Count	127	34	161
		%	78.9%	21.1%	100.0%

vWD pozitif ve vWD negatif köpekler arasında, D-dimer, fibrinogen, leucocytes, erythrocyte, hemoglobin ve PCV seviyeleri arasında önemli fark belirlendi (P<0.05) (Table V).

Table V. Some hematological parameters in vWD positive (1) and vWD negative (0) dogs.

Tablo V. vWD pozitif (1) ve negatif (0) köpeklerde bazı hematolojik parametreler.

	vWD	N	Mean± Std. Error Mean	Statistical Significance (student T test)
D-dimer (µg/l)	0	127	2914.96 ± 611.49	T= 2.91 P= 0.04
	1	34	1063.82 ± 174.69	
PT (sec)	0	127	7.30 ± 0.08	T=0.380 P=0.780
	1	34	7.24 ± 0.10	
APTT (sec)	0	127	17.09 ± 0.19	T=0.887 P=0.376
	1	34	16.74 ± 0.25	
TT (sec)	0	127	17.75 ± 0.19	T=0.732 P=0.466
	1	34	17.44 ± 0.42	
Fibrinogen (mg/dl)	0	127	294.06 ± 12.90	T=0.491 P<0.001
	1	34	193.03 ± 16.06	
Plt (10³/µl)	0	127	313.42 ± 12.18	T=1.788 P=0.077
	1	34	281.97 ± 12.69	
WBC (10³/µl)	0	127	20.72 ± 1.06	T=2.138 P=0.035
	1	34	17.32 ± 1.19	
RBC (10⁶/µl)	0	127	6.28 ± 0.14	T=-2.544 P=0.012
	1	34	7.03 ± 0.22	
HGb (g/dl)	0	127	15.54 ± 0.30	T=-2.578 P=0.011
	1	34	17.18 ± 0.53	
PCV (%)	0	126	44.55 ± 0.87	T= -2.582 P=0.011
	1	34	49.47 ± 1.75	

TARTIŞMA VE SONUÇ

Von Willebrand's hastalığı insan ve köpeklerde yaygın olarak görülen, hiçbir klinik semptom göstermeden ya da şiddetli hemorajik diatez sebebiyle ölüme kadar değişen klinik semptomlarla karakterize kanama hastalığıdır (17, 18). vWD'da vWF: Ag seviyesi ile tanı konulabilmekte ve taşıyıcılar belirlenmektedir. Köpeklerde, Brooks ve ark. (19) ve Kayar ve ark. (20) vWF: Ag konsantrasyonuna göre % 70-179 negatif, %51-59 şüpheli, % 2-49 taşıyıcı ve % 0.1-0.3 etkilenen olarak sınıflandırmışlardır. Raymond ve ark. (21) vWF: Ag konsantrasyonuna göre % 60 konsantrasyonundaki bireyleri negatif, % 50-59 şüpheli ve % 0-49 Taşıyıcı olarak

belirlemişlerdir. Ayrıca, Pathak (22) % 70-180 normal, %50-69 şüpheli ve %1-49 taşıyıcı olarak bildirmiştir. Sunulan çalışmada Burges ve ark. (13) ve Thomas (23) bildirdikleri ile uyumlu olarak vWF: Ag konsantrasyonu <%50 olan bireyler vWD pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Von Willebrand's hastalığı en yaygın kazanılmış ve inderiter kanama hastalığıdır (6). İnsanlarda vWD'nın prevalansı % 0.01-0.02 olarak tahmin edilmektedir (17, 24). Castaman ve ark. (25) genel popülasyonda hastalığın prevalansının %1 belirlendiğini ancak görülen klinik belirtilerin yalnızca %0.01 olduğunu bildirmişlerdir.

Scottish Terrier köpeklerde vWD'nın prevalansının % 18 ile % 30 arasında değiştiği bildirilmiştir (26-29). German Wirehaired Pointerslarda taşıyıcılığın %12 olduğu ve hastalığın %1 oranında geliştiği bildirilmiştir (19). Diğer bir çalışmada, Dutch Kookier köpeklerde bu oranın %5.2 (717 köpekten; 38 köpek tip III vWD) (30). Brooks ve ark. (27) %50 vWF: Ag konsantrasyonuna göre dobermanlarda %73, scottielerde %30 ve sheltielerde %28 vWD görüldüğünü bildirmiştir. Kayar ve ark. (20) bu oranı German Shepherd köpeklerde %26 olarak bildirmiştir. Sunulan çalışmada %50 vWF: Ag konsantrasyonuna göre bu oran tüm %21.1 olarak belirlendi. Hastalığın ırklara göre dağılımı ise Golden Retreiver (n=35) %34.3, Kangal (n=45) %11.1, German Shepherd (n=11) (%36.4), Labrador Retriever (n=7) %42.9, English Cocker Spaniel (n=2) %100, English Pointer (n=8) %25.0, mixed breed (n=8) %33.3, Husky (n=7) %12.5, Malinois (n=1) %100, Dogo Argentino (n=2) %50.0, Samoyed (n=1) %100 ve diğer ırklarda % 0 olarak tespit edildi. Köpeklerdeki prevalans oranlarındaki farkın, seçilen tanı metodu, hayvan ırkları ve çalışmaya alınan hayvan sayısından kaynaklanabileceği düşünüldü.

Brooks ve ark. (12) German wirehaired pointer köpeklerde yaptıkları çalışmada vWD ile yaş ve cinsiyet arasında ilişki olmadığını bildirmiştir. Benzer şekilde Similary, Kayar ve ark. (20) da yaş ve vWD arasında ilişki olmadığını belirlemişlerdir. Sunulan çalışmada da köpeklerde vWD ile yaş ve cinsiyet arasında ilişki olmadığı belirlenmiştir.

vWD köpeklerde; platelet sayısı, TT, PT, APTT sürelerinin genellikle normal sınırlar içerisinde olduğu bazen APTT süresinin çok az uzayabildiği bildirilmiştir (13, 20, 22, 30). Benzer şekilde sunulan çalışmada, platelet sayısı TT, PT ve APTT süreleri referans sınırlar içinde belirlenmiş olup vWD pozitif ve negatif gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır.

Sunulan çalışmada vWD'lı köpeklerde serum fibrinojen seviyeleri vWD olmayan köpeklere oranla istatistiksel olarak daha düşük bulunmuş olmakla birlikte normal sınırlar içinde bulunmuştur ($P<0,001$). vWD'lı köpeklerde serum fibrinojen seviyesinin normal sınırlar içinde olması daha önceki çalışmalarla uyumludur ^[15]. D-dimer pıhtılaşmış fibrinin primer dejenerasyon ürünüdür (31). Sunulan çalışmada serum fibrinojen seviyelerine paralel olarak vWD'lı köpeklerde serum D-dimer seviyesinin düşük bulunması pıhtı formasyonunun

oluşmasındaki yetersizlikle açıklanabilir.

Köpek yetiştirme programlarında vWD'lı ya da semptom göstermeyen taşıyıcı köpeklerin belirlenmesi oldukça önemlidir. Plazma vWF :Ag konsantrasyonunun sayısal olarak belirlenmesi vWD'lı köpeklerin ve taşıyıcıların belirlenmesinde kullanılan tanı yöntemidir (12, 27, 32,33). Bunun yanı sıra, Brooks ve ark. (19) German Wirehaired Pointers köpeklerinde vWD olmayan köpeklerin seçiminde tek başına vWF: Ag seviyelerinin kullanabileceğini bildirmiştir. Bununla birlikte . Slappendel ve ark. (30) Type III vWD taşıyıcısı 39 köpekte vWF: Ag seviyesinin %30-89 arasında değiştiğini bildirmiştir. Ayrıca insanlarda kalıtsallığın tahmininde vWF: Ag seviyesinin %35-75 oranında kabul edildiği bildirilmiştir (24). ELISA metodu kullanılarak belirlenen vWF: Ag konsantrasyonunun taşıyıcıların durumunu kesin olarak belirleyememesi nedeniyle vWD' sebep olan mutasyonun lokalizasyonu ve karakterinin belirlenmesi gerekmektedir (6). Etkilenen genin ve etki mekanizmasının belirlenmesi vWD'nın tedavisinin geliştirilmesinde de önemlidir. VWF insanlarda genin 12. kromozomunun kısa kolunda ve 52. ekzonda kodlanmaktadır (17, 34). İnsanlarda plazma vWF: Ag ile tek gen ilişkisi angiotensin-converting enzyme, the FUR2 locus, lipoproteinreceptor-related protein ve arginine vasopressin 2 reseptör değişkenlerinde bildirilmiştir (24). Kramer ve ark. (6) German Shorthaired Pointers ırkı köpeklerde tip II vWD 28. Ekzonda vWF nükleot değişkeni ile vWF multimer yetersizliği arasında istatistiksel önem olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, Scottish Terrierslerde 4. Ekzonda tek baz kaybı belirlenmiştir (26).

Venta ve Vidal (16) vWD'lığında *MspI* tarafından kesilebilen polimorfik bölgenin köpek VWF'nin exon 42. Ekzonunda varlığını bildirmiştir. Sunulan çalışmada da Venta ve Vidal (16) bulgularıyla paralel olarak 11 farklı ırkta, VWF *MspI* ile kesildiğinde polimorfik olduğu belirlenmiştir. Ayrıca farklı ırklarda kesim bölgesinin değişmediği de Venta ve Vidal ile uyumludur (16).

Sunulan çalışmada, Türkiye'de yetiştirilen vWD'lı 11 farklı köpek ırkı araştırıldı. Ayrıca, Venta ve Vidal (16)'den farklı olarak *MspI* sınırlı alan polimorfizmi ile vWF: Ag seviyesi arasındaki ilişki araştırıldı. Çalışmanın sonucunda; *MspI* sınırlı alan polimorfizmi ile vWF: Ag seviyesi arasındaki ilişki olmadığı belirlendi. Bunun sebebinin Slappendel ve ark. (30)'nın bildirdikleri gibi farklı ırklarda vWF : Ag seviyelerinin farklı olabileceği, ya da vWD teşhisi konulan hayvan sayısının azlığından kaynaklanabileceği düşünüldü. Ayrıca sunulan çalışmada kullanılan köpek ırklarının genotiplendirilmesinde kullanılan *MspI* bölgesinin mutant allele sahip bireylerin belirlenmesinde etkisiz olabileceği düşünüldü. Bu ihtimallerin test edilmesi için gelecekte hastalığın sık görüldüğü köpek ırklarında daha fazla hayvan materyali kullanılması gerektiği kanaatine varıldı.

SONUÇ:

Sonuç olarak; köpeklerde VWF'ninde ekzon 42'nin 2380 pozisyonunda *MspI* polimorfizmi ve plazma vWF: Ag seviyesi arasında ilişki belirlenmedi. Sunulan çalışmada köpeklerde VWF'ninde ekzon 42'nin 2380 pozisyonunda *MspI* polimorfizmi belirlenmesinin vWD'nin kesin tanısı için yetersiz olduğu düşünüldü. Bilgilerimize göre VWF ve vWF: Ag arasında ilişkinin bildirildiği ilk çalışma olması nedeniyle literatüre katkı sağlayacağını düşünüldü. Ayrıca çalışmanın diğer bir önemi klinik sendromlar ve klinik ilişkisinin belirlendiği nadir çalışmalardan biri olmasıdır. Bunun yanı sıra vWD hastalığı ve vWF: Ag seviyeleri kangal ırkı köpeklerde ilk kez bildirilmiştir.

KAYNAKLAR

1. **Turgut K:** Veteriner Klinik Laboratuar Teşhis, Bahçıvan Basım, Konya, 126-162, 2000.
2. **Slappendel RJ:** Bleeding tendency as a cause of epistaxis in the dog. *The Veterinary Quarterly*, 8:4, 329-333, 1986.
3. **Giger U:** Clinical approach to the bleeding dogs. The North American Veterinary Conference. 380-382, 2005.
4. **Harvey JW:** Differential diagnoses of bleeding disorders. The North American Veterinary Conference. 490-492, 2006.
5. **DeWilde L:** Canine inherited bleeding disorders. The North American Veterinary Conference. 48-51, 2007.
6. **Kramer JW, Venta PJ, Klein SR, Cao Y, Schall WD, Yuzbasiyan-Gurkan V:** A von Willebrand's Factor Genomic Nucleotide Variant and Polymerase Chain Reaction Diagnostic Test Associated with Inheritable Type-2 von Willebrand's Disease in a Line of German Shorthaired Pointer Dogs. *Vet Pathol*, 41:221-228, 2004.
7. **Ruggeri ZM:** Structure of von Willebrand factor and its function in platelet adhesion and thrombus formation. *Best Pract Res Clin Haematol*, 14:257-279, 2001.
8. **Denis CV:** Molecular and Cellular Biology of von Willebrand Factor. *International Journal of Hematology*, 75; 3-8, 2002.
9. **Sadler JE:** Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem*.

67:395-424, 1998.

10. **Patrick J. Venta, Jianping Li, Vilma Yuzbasiyan-Gurkan, George J. Brewer, and William D. Schall** Mutation Causing von Willebrand's Disease in Scottish Terriers. *J Vet Intern Med.* 14:10-19, 2000.
11. **Johnstone IB:** Desmopressin enhances the binding of plasma von Willebrand factor to collagen in plasmas from normal dogs and dogs with Type I von Willebrand's disease. *Can Vet J*, 645-648, 1999.
12. **Brooks MB, Castillo-Juarez H, Oltenacu P:** Heritability of plasma von Willebrand factor antigen concentration in German Wirehaired pointers. *Vet Q*, 23(3):126-128, 2001.
13. **Burgess HJ, Woods JP, Abrams-Ogg AC, Wood RD:** Evaluation of laboratory methods to improve characterization of dogs with von Willebrand disease. *Can J Vet Res*, 73(4):252-259, 2009.
14. **Burgess H, Wood D:** Validation of a von Willebrand factor antigen enzyme-linked immunosorbent assay and newly developed collagen-binding assay. *Can J Vet Res*, 72(5):420-427, 2008.
15. **Venta PJ, Li J, Yuzbasiyan-Gurkan V, Brewer GJ, Schall WD:** Mutation causing von Willebrand's disease in Scottish Terriers. *J Vet Intern Med*, 14:10-19, 2000. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2000.tb01493.x.
16. **Venta PJ, Vidal M:** MspI RSP in exon 42 of the canine von Willebrand factor (VWF) gene. *Animal Genetics*, 30: 229, 1999. DOI: 10.1046/j.1365-2052.1999.00404-5.x.
17. **Lillicrap D:** The molecular genetics of von Willebrand disease. *Haematologica Reports* 1(6):3-8, 2005. DOI:10.4081/hmr.v1i6.268.
18. **Ginsburg D, Bowie WEJ:** Molecular genetics of von Willebrand Disease. *Blood*, 79 (10): 2507-2519, 1992.
19. **Brooks M, Raymond S, Catalfamo J:** Plasma von Willebrand factor antigen concentration as a predictor of von Willebrand's disease status in German Wirehaired Pointers. *J Am Vet Med Assoc*, 209 (5):930-933, 1996.
20. **Kayar A, Or ME, Gönül R, Akdenizli E, Yaramış Ç, Bakirel U, Dodurka HT:** von Willebrand's disease in German Shepherd Dogs in the Marmara Region (Turkey). *Revue Méd Vét*, 157 (1): 11-15, 2006.
21. **Raymond SL, Jones DW, Brooks MB, Dodds J:** Clinical and laboratory features of a severe form of von Willebrand disease in Shetland Sheepdogs. *J Am Vet Med Assoc*, 197:

1342-1346, 1990.

22. **Pathak EJ**: Type 3 von Willebrand's disease in a Shetland sheepdog. *Can Vet J*, 45(8):685-687, 2004.
23. **Thomas JS**: von Willebrand's disease in the dog and cat. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 26(5):1089-1110, 1996.
24. **Desch KC, Ozel AB, Siemieniak D, Kalish Y, Shavit JA, Thornburg CD, Sharathkumar AA, McHugh CP, Laurie CC, Crenshaw A, Mirel DB, Kim Y, Cropp CD, Molloy AM, Kirke PN, Bailey-Wilson JE, Wilson AF, Mills JL, Scott JM, Brody LC, Li JZ, Ginsburg D**: Linkage analysis identifies a locus for plasma von Willebrand factor undetected by genome-wide association. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 8;110(2):588-593, 2013. DOI: 10.1073/pnas.1219885110.
25. **Castaman G, Federici AB, Rodeghiero F, Mannucci PM**: von Willebrand's disease in the year 2003: towards the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment. *Haematologica*, 88(1):94-108, 2003.
26. **Venta PJ, Li J, Yuzbasiyan-Gurkan V, Brewer GJ, Schall WD**: Mutation causing von Willebrand's disease in Scottish Terriers. *J Vet Intern Med*, 14(1):10-19, 2000. DOI: 10.1892/0891-6640(2000)014<0010:MCVWDI>2.3.CO;2.
27. **Brooks M, Dodds WJ, Raymond SL**: Epidemiologic features of von Willebrand's disease in Doberman Pinschers, Scottish Terriers, and Shetland Sheepdogs: 260 cases (1984-1988). *J Am Vet Med Assoc*, 200:1123-1127, 1992.
28. **Stokol T, Parry BW, Mansell PD**: Von Willebrand's disease in Scottish Terriers in Australia. *Aust Vet J*, 72:404-407, 1995. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1995.tb06188.x.
29. **Green RA, Thomas JS**: Hemostatic disorders: Coagulopathies and thrombosis. **In**: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 4th ed. 1946-1963, WB Sanders, Philadelphia, 1995.
30. **Slappendel RJ, Beijer EG, van Leeuwen M**: Type III von Willebrand's disease in Dutch Kooiker dogs. *Vet Q*, 20(3):93-97, 1998.
31. **Wannamethee SG, Whincup PH, Lennon L, Rumley A, Lowe GD**: Fibrin D-dimer, tissue-type plasminogen activator, von Willebrand factor, and risk of incident stroke in older men. *Stroke*, 43(5):1206-1211, 2012. DOI: 10.1161/STROKEAHA.111.636373.
32. **Clark P, Parry BW**: Survey of Irish Wolfhound in Australia for von Willebrands

disease. *Aust Vet J*, 72(10):393, 1995. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1995.tb06179.x.

33. **Moser J, Meyers KM, Russon RH:** Inheritance of von Willebrand factor deficiency in Doberman Pinschers. *J Am Vet Med Assoc*, 209;1103-1106, 1996.
34. **Sadler JE, Ginsburg D:** A database of polymorphisms in the von Willebrand factor gene and pseudogene. For the consortium on von Willebrand factor mutations and polymorphisms and the subcommittee on von Willebrand factor of the scientific and standardization committee of the international society on thrombosis and haemostasis. *Thromb Haemost*, 69(2):185-191, 1993.