



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİMENTAL IRKI DEĞİŞİK YAŞ GRUBUNDAKİ SIĞIRLARDA
TELOMERAZ ENZİMİ VE IgG DEĞERLERİNİN İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Vet. Hek. Serkan ÇETİNER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Şima ŞAHİNDURAN

BURDUR-2020

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİMENTAL IRKI DEĞİŞİK YAŞ GRUBUNDAKİ SIĞIRLARDA
TELOMERAZ ENZİMİ VE IgG DEĞERLERİNİN İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Serkan ÇETİNER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Şima ŞAHİNDURAN

Bu Araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü Tarafından 0582-YL-19 Proje Numarası ile Desteklenmiştir.

BURDUR-2020

TEŞEKKÜR

Lisans ve Lisansüstü eğitim sürecim boyunca; bilgi birikimini benden esirgemeyen, çalışma konusunun belirlenmesi ve yürütülmesinde bana yardımcı olarak katkıda bulunan ve her zaman desteğini bana hissettiren danışmanım Prof. Dr. Şima ŞAHİNDURAN'a ve hayatım boyunca en büyük dayanağım ve destekçim olan Babam ve Anneme teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	i
KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
BEYAN	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
TÜRKÇE ÖZET	xi
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Immun Sistem	2
2.2. Immunglobulinler	5
2.3. Immunglobulin Çeşitleri	7
2.3.1. IgG	7
2.3.2. IgM	9
2.3.3. IgA	10
2.3.4. IgE	10
2.4. Telomer	11
2.5. Telomeraz	19
2.6. Telomer, Telomeraz ve Yaşlanma	24
2.7. Telomeraz Enzimi Ölçüm Yöntemleri	29
2.7.1. TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) Yöntemi	29
2.7.2. Floresan-TRAP (F-TRAP) Yöntemi	30
2.7.3. TRAP-eze Yöntemi	30
2.7.4. TRAP-eze-Elisa Yöntemi	30
2.7.5. TMA-HPA (Transcription Mediated Amplification and Hybridization Protection Assay) Yöntemi	31
2.7.6. PicoGreen Yöntemi	31

2.7.7. In Situ-PCR Yöntemi	32
2.7.8. RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) Yöntemi	32
2.7.9. Stretch-PCR (Stretch-PCR assay) Yöntemi	33
2.8. Telomer Uzunluğu ve Telomer Kaybı	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. Gereç	37
3.1.1. Gerecin Tanımı	37
3.1.2. Hayvan Materyali	37
3.2. Yöntem	37
3.2.1. ELISA Yöntemi ile Telomeraz ve Immunglobulin Verilerinin Toplanması	38
3.3. İstatiksel Analiz	40
4. BULGULAR	41
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	46
7. KAYNAKLAR	47
8. ÖZGEÇMİŞ	63

ŞEKİLLER

Şekil 3.1. Kan serumlarının ELISA kitine konulması	38
Şekil 3.2. ELISA yöntemi ile serumda telomerez düzeyinin ölçümü	39
Şekil 3.3. ELISA yöntemi ile serumda IgG düzeyinin ölçümü	40



TABLÖLAR

Tablo 3.1. ELISA yöntemiyle kan serumunda telomeraz enzimi ölçümünün özeti	39
Tablo 4.1. Simental ırkı sığırlarda farklı yaş gruplarında serum telomeraz ve IgG düzeyleri	41



SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde işareti
>/<	Büyüktür/Küçüktür
±	Artı/Eksi İşareti
μL	Mikrolitre
bp	Baz Çifti
°C	Santigrad
dCTP	Deoxycytidine Triphosphate
Dk	Dakika
D-loop	Displacement Loop
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Est1	Ever Shorter Telomerase 1
Fab	Antijene Bağlanma Bölgesi
Fc	Hücreye Bağlanma Bölgesi
HSC	Hematopoetik Kök Hücreleri
hTERC	Human Telomerase RNA Component
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
kb	Kilobaz
kbp	Kilobaz çifti
M1	Mortalite 1 Evresi
M2	Mortalite 2 Evresi
mg/dl	Minigram/Desilitre
ml	Minilitre
mRNA	Mesajcı RNA
mtDNA	Mitokondriyal DNA
Ng	Nanogram
Nm	Nanometre

PBMC	Periferik Kan Mononükleer Hücresi
PCR	Polimerase Chain Reaction
PD	Population Doubling
POT1	Protection of Telomeres-1
pRB	Retinoblastoma Proteini
p16	Siklin-Bağımlı Kinaz İnhibitör 2A
p21	Siklin-Bağımlı Kinaz İnhibitör 1A
p53	Tümör Protein 53
p123	Euplates aediculatus TERT proteini
Rap1	Repressor/Activator Protein 1
Rb	Retinoblastoma Geni
TERC	Telomerase RNA Component
TERT	Telomeraz Revers Transkriptaz
TIN2	TRF1-Interacting Nuclear Factor 2
T-loop	Telomer Loop
TP1	Telomeraz Protein Komponenti
TPP1	Tripeptidylpeptidase 1
TR	Telomeraz RNA Alt Birimi
TRAP	Telomeric Repeat Amplification Protocol
TRF	Telomere-Repeat-Binding Factor
TRF1	Telomere-Repeat-Binding Factor 1
TRF2	Telomere-repeat-Binding Factor 2

ÖZET

Simental Irkı Değişik Yaş Grubundaki Sığırlarda Telomeraz Enzimi ve IgG Değerlerinin İlişkinin Araştırılması

Telomerler, spesifik karakterde olup heterokromatin yapısındadırlar. Ökaryotiklerde lineer kromozomların uç bölgelerinde yer alırlar ve gen kodlamazlar. Hücrelerin yaşlanma ve çoğalma kapasiteleri ile doğrudan bağlantılı olan telomerler kromozom yapısının korunması ve kromozomun stabilitesinin sağlanmasında da yer almaktadırlar. Telomer uzunluğunun muhafaza edilmesi yaşlanmayla görülebilecek hastalıklardan kaçınmak ve hücrel yaşlanmadan sakınmada etkin bir rol üstlenebileceğini akıllara getirmektedir. Telomerlerin boyları her hücre bölünmesinde bir miktar kısılır. Telomer dizilerinin uzatılmasından telomeraz enzimi sorumludur. Immunglobulinler, antikorların moleküler yapısı olarak düşünülebilir. Glikoprotein yapısındadırlar. Ruminantlar plasental yolla gebelik döneminde immunglobulin alamadıklarından solunum ve intestinal mukozalarla alınabilecek hastalık yapıcı etkenlere karşı yeni doğduklarında dirençsiz doğarlar. Yeni doğduklarında aldıkları kolostrumla birlikte IgG de alırlar ve IgG'ler buzağıyı septisemiye karşı dirençli hale getirirken ince bağırsaklardan emilmeyen IgG'ler bölgesel bağışıklık sağlar. IgG, tüm vücut sıvılarında tespit edilebilir, antikorların %75-80'nini oluşturur. Bazı bakteri, virüs ve mantarların hastalık yapma potansiyellerine karşı koyarlar. Yetişkin hayvanlardaki toplam plazma ve serum protein oranlarının hemen hemen %20'sini oluştururlar. Virüs ve bakterilere karşı metabolizmayı koruyan temel yapılardır. Bu çalışmanın amacı yaştan ilerlemesi ile immün sistemde önemli yeri olan IgG ile telomeraz enziminin seviyelerini değerlendirmektir. Araştırma materyalini, Burdur ilinde bulunan çeşitli çiftliklerdeki Simental ırkı 1 günlük buzağı 8 adet (4 dişi, 4 erkek), 6 aylık buzağı 8 adet (4 dişi, 4 erkek), 1 yaşında dana 8 adet (4 dişi, 4 erkek) 4 yaşında sığır 12 adet (6 dişi, 6 erkek) ve 6 yaşında 10 adet (5 dişi, 5 erkek) sığır toplam olarak 46 hayvan oluşturdu. Hayvanlardan alınan kan örnekleri santrifüje tabi tutulduktan sonra serumları ayrıldı. Daha sonra uygun ELISA kitleri kullanılarak telomeraz enzim düzeyleri ve IgG düzeyleri ölçülüp karşılaştırıldı. Sonuç olarak; Simental ırkı sığırlarda yapılan çalışmada yaşlanmayla birlikte telomeraz enzim aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir. İlk dört grupta IgG düzeyi azalmazken 6 yaşındaki hayvanlarda IgG ve telomeraz değerleri arasında pozitif korelasyon ilişkisi saptanmıştır. Ayrıca aynı yaş gruplarında olan hayvanlarda anlamlı fark gözlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Sığır, Yaş, Telomeraz, IgG

ABSTRACT

Investigation of the Relationship between IgG and Telomerase Immunglobulin In Simental Cattle In Different Age Groups

Telomeres are of specific character and are in the structure of heterochromatin. In eukaryotic, they are located in the end regions of linear chromosomes and do not encode genes. Telomeres, which are directly related to the aging and proliferative capacities of the cells, are also involved in maintaining the chromosome structure and ensuring the stability of the chromosome. Keeping the length of telomere suggests that it can play an effective role in avoiding diseases that can be seen with aging and avoiding cellular aging. Telomeres are slightly shortened in each cell division. Telomerase enzyme is responsible for the extension of telomere sequences. Immunglobulins can be thought of as the molecular structure of antibodies. They have a glycoprotein structure. Ruminants are born insensitive to the disease-causing factors that can be taken by respiratory and intestinal mucosa since they cannot receive immunoglobulin during pregnancy by placental route. When they are born, they also take IgG with the colostrum they take, and IgGs make the calf resistant to septicemia, while the IgGs that are not absorbed from the small intestines provide regional immunity. IgG can be detected in all body fluids, making up 75-80% of antibodies. IgG resist the disease-causing potential of some bacteria, viruses and fungi. They constitute almost 20% of the total plasma and serum protein ratios in adult animals. They are the basic structures that protect metabolism against viruses and bacteria. The aim of the study is to evaluate the levels of IgG and telomerase enzyme, which have an important place in the immune system with aging. The research material was composed of cattle in farms in Burdur province. In total, blood samples were collected from 46 bovine animals. The research material was carried out in various farms in Burdur province, 1-day-old simental breed 8 calves (4 females, 4 males), 6 months old 8 calves (4 females, 4 males), 1 year old 8 calves (4 females, 4 males), 4 years old 12 cattle (6 females, 6 males) and 6 years old 10 cattle (5 females, 5 males) made up 46 animals in total. After the blood samples taken from the animals were subjected to centrifugation, their serum was separated. Then, Telomerase enzyme levels and IgG levels were measured and compared using appropriate ELISA kits. As a result; In the study conducted on Simental breed cattle, it was observed that telomerase enzyme activity decreased with aging. While IgG level did not decrease in the first four groups, a positive correlation was found between IgG and telomerase values in 6-year-old animals. In addition, no significant difference was observed in animals of the same age groups.

Keywords: Cattle, Age, Telomerase, IgG

1. GİRİŞ

Immun sistem vücudun savunmasından sorumlu bir mekanizmadır. Metabolizmanın işleyişini sekteye uğratabilecek ve metabolizma için zararlı olabilecek olay, durum ve etkenlerle savaşıır. Bu savunucuların başında da IgG gelmektedir. Antikorların büyük çoğunluğunu oluşturan IgG savunma zincirinin olmazsa olmazlarındandır.

Telomerler kromozomun uç kısımlarında bulunur ve hücresel yaşlanmada işlevsel bir görev üstlenir. Telomer uzunlukları her hücre bölünmesinde bir miktar kısalır. Bu kısalma hücresel yaşlanmayla doğrudan alakalıdır.

Telomeraz enzimi ise kısaca telomer boylarının uzatılmasından sorumludur. Hücre yaşlanmasında ve bölünmesinde anahtar rol oynar. Uzun yaşamın sırrının telomer, telomeraz ve IgG arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılabilmesi, yorumlanması ve bu mekanizma üzerine daha çok çalışılması ile alakalı olabileceği akıllara gelmektedir.

Bu çalışmada hücrenin yaşlanmasında ve çoğalmasında hayatı görevleri olan telomeraz enzimi ile metabolizmanın işlevlerini stabil bir şekilde sürdürebilmesi için elzem olan IgG arasındaki ilişkinin simental ırkı hayvanlarda yaşlara göre kıyaslanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Immun Sistem

Bağıışıklık sistemi metabolizmayı yabancı maddelere ve tümör hücrelerine karşı korur. Virüs ve bakteriyel enfeksiyonlarla savaşıır. Anormal biyolojik etkenlere karşı vücudu koruyan bazı hücre ve organlardan oluşan bir sistem olarak düşünölebilir. Eđer bağıışıklık sistemi direncini kaybeder ve bağıışıklık düzeyi gerilerse hastalık yapıcı etmenler vücutta gelişebilir. İmmun sistemin baskılanması patojen mikroorganizmalara karşı vücudu savunmasız bırakır (Wilkie, 1974). Memeli canlılarda immun sistem gebeliğin erken dönemlerinden itibaren gelişmeye başlar. Gebelik zamanı az olan canlıların yeni doğanlarında immun sistem çok gelişmemiştir (Cortese, 2009).

İmmunglobulin zincirleri sabit ve değişken bölgeler barındırır ve ilmekler şeklinde bir yapılaşma gösterirler (Marnila ve Korhonen, 2002b). Vücut sıvılarında ve kan serumunda gözlenir. Yüksek moleküler ağırlığa sahiptir (Butler, 1969).

Yeni doğan buzağılarda sıklıkla görölebilen solunum ve sindirim problemleri immünolojik, genetik, mikrobiyolojik, fiziksel, psikolojik ve beslenme kaynaklı olabilir (Roy, 1980). İmmunglobülinlerin, yeni doğanlarda meydana gelebilen pasif transfer yetmezliğinde myelofibrozis vakalarında, otoimmün trombositopeni ve hemolitik anemi olgularında kullanıldığı bildirilmiştir (Hammer, 2004; Kol, 2008; Bianco ve ark., 2007; Kellerman ve Bruyette, 1997; Scott-Moncrieff ve ark., 1997).

Doęal bağıışıklık; metabolizmanın yapısal ve genetik yapısıyla ilgili olarak özel uyaranlara verdiği reaksiyondur. Edinsel bağıışıklık ise doğumdan sonra ya da intrauterin yaşamda özel substansların uyarılarına karşı oluşan dirençtir. Aktif ve pasif bağıışıklık olmak üzere 2'ye ayrılır. Canlıya ilgili mikroorganizmalar uygulandığında (yapay aktif bağıışıklık) veya metabolizma söz konusu uyaranlara maruz kaldığında (doğal aktif bağıışıklık) zamanla uyaranlara karşı aktif edinsel bağıışıklık şekillenir. Mikroorganizmalarla daha önce karşılaşılıp onlara karşı üretilmiş olan antikorların

başka bir canlıya aktarılmasıyla pasif edinsel bağışıklık şekillenir (Brambell, 1958; Kuby, 1994; Selk, 1998).

Pasif bağışıklık kolostrum almayla ilişkili olduğu için pasif bağışıklığa kolostral bağışıklıkta denir (Pauletti ve ark., 2003). Buzağılarda pasif immunitenin oluşabilmesi için kolostrumdaki immunglobulinlere ihtiyaç vardır (Zarrili ve ark., 2003). Kolostrum, yeni doğmuş buzağılarda bazı hastalık yapıcı etkenlere karşı direnç kazanmaları için maternal immunglobulinleri sağlar (Wallace ve ark., 2006). Yeterli seviyede kolostrumla immunglobülin alan ruminantlar almayanlara göre gelişmelerinin gözle görülebilir derecede iyi olduğu, yaşama şanslarının daha fazla olduğu belirtilmiştir (Christley ve ark., 2003; Massimini ve ark., 2006a; Massimini ve ark., 2006b). Dünyaya yeni gelen ruminantların tam zamanında kolostrum almasıyla serumlarındaki IgG seviyesinin artması kolostumun immun değerinin belirlenmesinde önemli bir ölçüttür (Hagiwara ve ark., 2000, Yamanaka ve ark., 2003b, Albera ve Kankofer, 2009; Cortese, 2009; Mutinati ve ark., 2014).

Alınan immunglobülin düzeyi, kolostural immunglobülinler ve ilk beslenme zamanı pasif transfer üzerinde etkisi olan önemli etkenlerdir (Abel ve Quigley, 1993). Pasif transfer yetmezliği yeni doğmuş buzağılarda büyük oranda öldürücüdür. Yeni doğan buzağılarda en iyi ihtimalle 4-6 saat içerisinde kolostrum alması önerilmektedir. Bağışıklık sağlayıcı etmenlerin pinositoz yoluyla dolaşım sistemine geçmesiyle pasif transfer gerçekleşmiş olur (Christley ve ark., 2003; Nowak ve Poindron, 2006; Khan ve ark., 2006, Andres ve ark., 2007). Yapılan bir çalışmada pasif transfer yetmezliği bulunan buzağılarda mortalite oranlarının pasif transfer göstermeyenlere göre daha fazla olduğu bildirilmiştir (Robinson ve ark., 1988). Pasif transfer yetmezliği görülmüş olan buzağılarda ilerleyen zamanlarda canlı ağırlık artışında azalma, mortalite ve morbidite oranlarında artma gözlenmiştir (Wittum ve Perino, 1995). Bazen yeni doğan ruminantlar zamanında kolostrum almasına rağmen pasif transfer yetmezliği gösterebilir. Bu durum kolostrum seviyesindeki düşük IgG miktarından kaynaklanır (Khan ve ark., 2006; Andres ve ark., 2007; Tabatabaei ve ark., 2013; Vatankhah, 2013). Ruminantlarda pasif transfer yetmezliğinin engellenmesi için materyal immün etkenlerin arttırılması, zamanında ve yeteri kadar kolostrum verilmesi önerilen seçeneklerdir (Anugu ve ark., 2013; Abuelo ve ark., 2014; Hall ve ark., 2014).

Bazı araştırmacılar yetersiz pasif immunitenin eşik değerlerini ‘<2400 mg/dl’ (Dewell ve ark., 2006; Waldner ve Rosengren, 2009). ‘<1200 mg/dl’ (Robinson ve ark., 1988). Düzeylerin de olduğunu bildirmişlerdir. Günümüzde en çok kabul gören IgG yoğunluğunun değeri ise <1200 mg/dl’dir (Robinson ve ark., 1988). Septiseminin neden olduğu ölümlerin immunglobulin eşik değerinin <500 mg/dl ile <800 mg/dl arasında olduğu görülmüştür (Godson ve ark., 2003; Fecteau ve ark., 2009).

Immun sistem organları primer ve sekonder lenfoid organlar olmak üzere ikiye ayrılır. Primer organlar memelilerde kemik iliği ve timüs, kuşlarda ise bursa fabrisiyus ve timustan oluşur. Primer lenfoid organların görevleri arasında immun sistemin kontrol ve düzenlenmesi yer alır (Abdou ve Abdou, 1972). Primordiyal timus, epikardiyal kord şeklinde gebelik süresinin ilk 27-30. Günlerinde ruminantlarda görülebilir. Gebelik süresinin ikinci çeyreğin bitimine yakın timus en büyük haline ulaşır ve doğum sonrasında küçülür. Pubertas zamanında timus iyice gerilemeye başlar ilk kızgınlıkla beraber fonksiyonel özelliğini kaybeder (Cortese, 2009).

Lenfositler, inflamasyonlu bölgelere gitme yeteneğindeki immun sistem elemanlarıdır (Burnet ve Ferner, 1949). Primer organlarda farklılaşır daha sonra sekonder lenfoid organlara giderek burada çoğalırlar ayrıca bağışıklık için göstermeleri gereken reaksiyonları sekonder lenfoid organlardan gösterirler. Böylece primer organlardan sekonder organlara lenfositler, fonksiyon hücreleri olarak geçmiş olurlar. İlkel ilik stem hücreleri, bursa fabrisiyus ya da timüsta yer alan lenfositlerin yeni yavru hücrelere dönüşümleri ve birincil organlardan ikincil organlara yerleşip, erişkin bağışık sistemi elemanı olmak üzere bağışıklık sisteminde işlevsel bir rol üstlenebilmesi için, lenfositlere olanak tanır (Wilkie, 1974).

Plazma hücreleri ise B lenfositlerinin farklılaşmasıyla oluşur. Antikor sentezi plazma hücreleri tarafından yapılır (Chone ve Milstein, 1967; Kerhli ve ark., 1991). B lenfositler kemik iliği veya bursa kökenli olup humoral immun yanıtta sorumlu iken timik kökenli T lenfositler hücresel immun yanıtta sorumludur. B ve T lenfositler, lenf dokusunda kendine has bir yayılım gösterir. B lenfositler, lenf bezlerinin medulla kordlarında ve lenf bezlerinin dış korteksinde üretilirler (Wilkie, 1974). T lenfositler; intraselüler bakteriler, tümör hücreleri, intraselüler parazitler gibi etkenlerle

karşılaştıklarında antikor üretmezler ancak söz konusu hücreleri yıkımlarlar. Ayrıca bu uyarılarla karşılaştıklarında lenfokin adı verilen radikalleri serbest bırakırlar (Burton ve Kehrlı, 1996).

2.2. Immunglobulinler

Vücut sıvılarında ve kan serumunda gözlenir. Yüksek moleküler ağırlığa sahiptirler (Butler, 1969). Protein yapısındadırlar (Hammer ve ark.,1971; Duncan ve ark., 1972). Zincirleri sabit ve değişken bölgeler barındırır. İlmekler şeklinde bir yapılaşma gösterirler.

İmmunglobulinler polipeptid zincirlerinden meydana gelir. Bu zincirlerde kendi arasında hafif zincir ve ağır zincir olmak üzere ikiye ayrılır. Hafif zincirlerin her biri hemen hemen 220 aminoasitten meydana gelir. Ağır zincirlerin her biri ise hemen hemen 400 ile 500 aminoasitten oluşmaktadır. Zincirler arasında disülfid bağları mevcuttur. Bu bağlarla birlikte molekül ‘Y’ harfine benzeyen bir görünüm kazanır. Zincirlerin bir ucu karbon ile sonlanır diğer ucu ise amino grubu ile sonlanır. Disülfid bağlarının bulunma durumları ve miktarları immunglobulin çeşitlerine ve alt sınıf çeşitlerine göre değişebilir (Marnila ve Korhonen, 2002b). Bu yapılar birbirlerine kovalent ve kovalent olmayan bağlarla bağlanır.

Antikorlar proteolitik olarak 2 Fab kısım (Antijene bağlanmayı sağlayan kısmı barındırır) ve 1 Fc kısmı (Ig’lerin hücreye ya da Fc reseptörlerine bağlanmasını sağlar.) olarak ikiye ayrılır (Gapper ve ark., 2007).

Immunglobülinlerin antijenik, fizyokimyasal ve biyolojik özellikleri farklılık gösterir (Hammer ve ark., 1971; Duncan ve ark., 1972). Yapısal olarak çeşitleri mevcuttur. Ruminantlarda IgA, IgG, IgM (Mehra ve ark., 2006). IgE (Thatcher ve Gershwin, 1989). Olmak üzere 4 çeşit immunglobülin gözlenmiştir (Bergmann-Leitner, 2008). IgG’nin IgG1 ve IgG2 olmak üzere 2 alt sınıfı mevcuttur (Hammer ve ark., 1971; Duncan ve ark., 1972). Immunglobulinlerin aminoasit içerikleri memeli canlıların süt içeriğinde bulunan veya kan serumunda mevcut olan aminoasit varlığından farklıdır. Immunglobülindeki ağır zincir farklı işlevsel özelliklerin

kaynağıdır (Bergmann-Leitner, 2008). Sinepiteliokoryal kotiledon tipi plasenta bulunan ruminantlar plasenta yapısına bağlı olarak kanda gammaglobulin bulunmadan dünyaya gelir ve antijenik sensitivite görülmez (Salmon, 1999). Kolostrum alımında ilk 24 saat büyük önem arz etmektedir. Zamanla ters orantılı olarak kolostrumdaki immunglobulin miktarı azalmaktadır (Jorgensen, 1991). Kolostrumda savunma sistemi materyallerinin az yer almasının önüne annenin yeterli ve dengeli beslenmesi, stres faktörlerinden uzak tutulması ve immun sistem uyarıcılarının kullanılması ile mümkün olabilmektedir. Yeni doğan sığırlarda hastalık yapıcı etkenlere karşı korunma da kolostrumdan alınan antikorlar etkilidir. (Logan, 1996).

Ruminantların kolostrum içeriği antikor bazında incelendiğinde IgA, IgM ve IgG olmak üzere 3 çeşit antikor görülür. Immunglobulinler kolostrum içeriğinde yer alan en kıymetli antimikrobiyal yapılardır. Immunglobülinlerin %85-90'nı IgG (%80-90'nı IgG1'den oluşmaktadır), %7'sini IgM ve %5'ini IgA oluşturmaktadır (Godden, 2008). IgG1 yeni doğmuş buzağının pasif immun sistemi için gerekli Ig'dir ve komplemente bağlanma özelliği gösterir. IgG2 maternal kolostrum, salya ve sütte az seviyede bulunurken kan serumunda yüksek miktarda bulunur (Butler, 1969).

Plasental yolla gebelik döneminde immunglobulin alamayan ruminantlar solunum ve intestinal mukozalarla alınabilecek hastalık yapıcı etkenlere karşı yeni doğduklarında dirençsizlerdir (Salmon, 1999). Bazı ruminant ırklarında spesifik immunglobulin özellikleri mevcuttur. Örneğin İsviçre esmerinin buzağılarında belirli antijenlere karşı antikor üretebilme özelliğinin birçok sığır ırklarına göre gelişmiş olduğunu tespit edilmiştir (Schultz ve ark., 1971). Pirojenik enfeksiyonlara karşı artan sensitivite ile ilgili olarak Danimarka kırmızılarında belirgin bir IgG2 eksikliği gözlenmiştir (Nansen, 1972). Holstein ırkı ineklerin kolostrumları Jersey ırkı ineklere oranla daha az immunglobülin içeriği barındırdığından Jersey ırkı ineklerin buzağılarının serumlarında immunglobülin miktarı daha fazladır (Tennant ve ark., 1969).

Immunglobülinlerin yarılanma ömürleri birbirlerine göre farklılık göstermekte olup IgA'nın yarılanma ömrü 2, IgM'nin 4, IgE'nin 1 gün ve IgG'nin yarılanma ömrü hemen hemen 20 gündür (Porter, 1972; Burton ve ark., 1989; Thatcher ve Gershwin,

1989; Selk, 2000). Yani immunglobülinler içinde IgG en uzun yarılanma ömrüne sahiptir (Kacskovics ve ark., 2006). IgG ve IgM'nin enterik infeksiyonlara karşı olumlu etkilerinden söz edilebilir. IgA vücut yüzeyindeki infeksiyonlarda, IgM septiseminin önlenmesinde görev alır. IgM ve IgG'nin sistemik infeksiyonlara karşı koruyucu etkisi vardır (Muller ve Ellinger, 1981). IgM, büyük moleküllü bir immunglobülün olup komplement fiksasyonunda, aglütinasyonda ve opsonizasyonda etkilidir (Pike, 1967). Ruminantlarda bulunan IgM nötralizasyon ve aglütinasyon fazı, komplement fiksasyon ve hemolizde IgG'den daha etkilidir (Butler, 1969). Yeni doğmuş buzağların kolostrum alımıyla birlikte geçen maternal IgE'nin intestinal sistemde görülebilecek parazitlere karşı direnç gösterdiği tespit edilmiştir (Thatcher ve Gershwin, 1989).

Immunglobülinlerin kombine olarak kullanılması tek başlarına kullanılmasından daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Yoğunlaştırılmış IgG'ler, yoğunlaştırılmış IgM'lere göre buzağı septisemilerinde daha etkisizdir (Logan ve Penhale, 1971). Atların kolostrumlarında az miktarda IgA, IgM ve daha yoğun oranda IgG bulunur (Giguère ve Polkes, 2005). Tayların annelerinden geçen pasif bağışıklığın miktarının belirlenmesinde kolostrumdan alınan IgG miktarı baz alınmaktadır (Perkins ve Wagner, 2015).

2.3. Immunglobulin Çeşitleri

Günümüze kadar tespit edilmiş 4 farklı ruminant immunglobülini vardır. Immunglobülinlerin antijenik, fizyokimyasal ve biyolojik özellikleri farklılık gösterir. Bu immunglobülinler IgM, IgE, IgA ve IgG'dir. Ancak IgG'nin IgG1 ve IgG2 olmak üzere 2 alt sınıfı mevcuttur (Hammer ve ark., 1971; Duncan ve ark., 1972). Immunglobülinlerin hemen hemen %85-90'ını IgG (%80-90'nı IgG1'den oluşmaktadır), %7'sini IgM ve %5'ini IgA oluşturmaktadır (Godden, 2008).

2.3.1. IgG

Immungolubin G'ler çok hücreli hayvansal organizmaların immun sistemleri tarafından kendi yapısından olmayan organik yapılarla mücadele etmek için üretilen

moleküllerdir. Glikoprotein yapısındadırlar. Tüm vücut sıvılarında tespit edilebilirler (Tizard, 2004). Kanda en çok bulunan immunglobülin olan IgG kan serumu ve kolostumda bulunan immunglobülinlerin neredeyse %85-90'ını oluşturur (Klaus ve ark., 1969). IgG, 50.000 molekül ağırlığına sahip iki ağır zincirin iki hafif zincire bağlanmasıyla meydana gelir. Hemen hemen 446 aminoasitten oluşur. Bivalent yapı gösterirler. Bu yapısı sayesinde iki antijene bağlanabilir. 2 bakteriyle birlikte aglütinasyon reaksiyonuna katılabilir ya da immun kompleks oluşturabilir (Aalund ve ark., 1971; Gershwin, 1990). IgG immunglobulinler içerisinde katabolik oranı en düşük olandır. Ayrıca immunglobülinler içinde en uzun yarılanma ömrüne sahiptir (Kacskovics ve ark., 2006).

En küçük immunglobulin katagorisinde olduğundan diğer immunglobulinlere göre damarlardan daha kolay geçer (Mehra ve ark., 2006). IgG'nin damar içi alan varlığı, IgM'nin büyük moleküler yapıda olmasından dolayı IgM'ye göre daha fazladır (Waldman, 1969; Husband ve ark., 1972). Tüm IgG alt sınıflarının immun yanıt sırasında oluşma potansiyeli vardır. Ancak belli bir uyarana karşı IgG alt sınıfı en fazla oluşmaktadır. IgG en çok ikincil immun cevap sırasında üretilir. Genellikle belli antijenlere karşı tek bir IgG alt sınıfı üretilir (Hammer ve ark., 1968).

IgG'ler bakteriyel aglütinasyon ve opsonizasyonda, toksin nötralizasyonu ve virüs nötralizasyonunda etkin role sahiptirler (Beer ve ark., 1974). Mikrobiyal antijenlerle ve toksinlerle bağ kurarak metabolizmadan uzaklaştırılmasında görev alır ayrıca bazı mukozal yüzeylerde ve doku sıvılarında da bağışıklık sağlarlar. Lenf düğümleri, kemik iliği ve dalaktaki plazma hücreleri tarafından üretilirler (Mehra ve ark., 2006). IgG, elektroforetik hareketleri bakımından IgG1 ve IgG2 olmak üzere farklı iki alt sınıfa ayrılır (Campbell ve ark., 1977). IgG1, IgG2'ye göre serumda daha az oranda bulunur ve IgG1, IgG2'ye göre daha az homojendir (Korhonen ve ark., 2000; Butler, 1969). Kandaki IgG konsantrasyonu alt birimlerin toplamı kadardır. Hayvan türlerine göre IgG'lerin alt sınıflarının sayısı değişir (Marnila ve Korhonen, 2002b). Alt sınıflarının ağır zincirlerinde çok küçük bir farklılıklar mevcuttur (Larson ve ark., 1980). Sığırların kolostrumlarında IgG1'ler diğer immunglobulin sınıflarına göre daha fazla oranda görünür. IgG1 ve IgG2'ler intersitisyel sıvılara geçebilirler sadece kan vasküler sınırları içerisinde kalmazlar. IgG'lerin alt sınıfları, hiperimmunize olmuş

hayvan serumlarında yüksek konsantrasyonda bulunurlar (Mach ve Pahud, 1971; Duncan ve ark., 1972). IgG1 yenidoğmuş buzağının pasif immun sistemi için gereklidir ve komplemente bağlanma özellikleri gösterir. IgG2 maternal kolostrum, salya ve sütte az seviyede bulunurken kan serumunda yüksek miktarda bulunur (Butler, 1969).

Buzağılar yeni doğduklarında aldıkları kolostrumla birlikte IgG de alırlar ve buzağıyı septisemiye karşı dirençli hale getirirken ince bağırsaklardan emilmeyen IgG'ler bölgesel bağışıklık sağlar (Logan ve Pearson, 1978; Fecteau ve ark., 2009). IgG2 seviyesi serumda canlıdan canlıya değişmekte olup IgG1 ruminant kolostrumunda en çok oranda görülen (%50-80) immunglobulin çeşididir (Dettileux ve ark., 1994; Aldridge ve ark., 1998; Marnila ve Korhonen, 2002b). Kolostrumdan bağırsak yoluyla emilen IgG1'lerin yaklaşık %75'i yavruya aktarılır (Cabello ve Levieux, 1980). Bakteriyal nötralizasyon ve liziste IgG1'ler IgG2'lere göre daha etkindirler ve yalnızca IgG1'ler komplementi fikse edebilirler (Beh, 1973).

2.3.2. IgM

IgM'ler kanda %10-15 civarında mevcut olan bir immunglobulin çeşididir. Mukozal yüzeylerde ve doku sıvılarında az rastlanırlar bunun nedeni ise büyük bir yapıya sahip olmalarıdır. IgM'nin alt sınıfı yoktur (Hammer ve ark., 1968). Gram negatif bakterilere karşı çok etkilidirler. Ayrıca antikor üretme yönelimindedirler (Butler ve ark., 1972; Duncan ve ark., 1972). Sığırlarda bulunan IgM antijenik olarak farklı bir makroglobulindir (Butler, 1969). IgG'ler ile IgM'ler arasında benzerlikler söz konusudur. IgM en fazla yoğunluğa primer immun cevap sırasında ulaşır (Hammer ve ark., 1968). Nötralizasyon ve aglütinasyon fazı, komplement fikzasyon ve hemolizde IgG'den daha etkilidir (Butler, 1969). IgM'lerin virüsleri etkisiz hale getirme ve bakterilerin aglutine etmede gücü IgG'ye göre daha fazladır (Hammer ve ark., 1968; Mehra ve ark., 2006).

IgM'lerin serumda bulunma miktarı hemen hemen kolostrumdaki oranın yarısı kadardır (Butler ve ark., 1972; Duncan ve ark., 1972). Protozoa ve bakterilerden kaynaklanabilecek paraziter hastalıklara karşı IgM önemli bir koruyucu rol üstlenir

(Detilleux ve ark., 1994). Kolostrumla alınan IgM'ler bağırsak yoluyla emilirler ve yavruya geçerler (Cabello ve Levieux, 1980). IgM'ler IgG'lere göre daha büyük bir yapıdadırlar. Bu büyük yapılarından dolayı bakteriyal opsonizasyon, aglütasyon ve komplement nötralizasyon ve aktivasyonda IgG'ye göre daha az üretilmelerine rağmen daha etkilidirler (Hurley ve ark., 1990).

2.3.3. IgA

IgA, deride var olan plazma hücreleri ve bazı mukozal bölgelerdeki lenf dokularındaki plazma hücrelerince üretilir. Yaklaşık olarak kanda %10-15 seviyelerinde bulunur. IgA mukozal bölgelerdeki mikroorganizmaları tutar, toksinlerin nötralize edilmesinde görev alır ve toksinlerin mukuzal yüzeylerde tutunmasını engeller. Hastalık yapıcı birçok etkenin vücuda alınmasını engeller (Marnila ve Korhonen, 2002b; Mehra ve ark., 2006). Çoğu hayvan türünde solunum yollarının viral enfeksiyonlardan korunmasında etkilidir.

IgA tüm sekresyonlarda bulunmaz fakat baskın bir immunglobulin grubudur. Komplement fikzasyonda ve opsonizasyonda rol almaz (Ziparsky ve ark., 1973). Bakterilerin patojenitesinde asıl önemli olan noktalardan biri, mikroorganizmaların epitelyal alanlara temasının engellenmesidir. IgA'larda komplement fikzasyonda ve opsonizasyonda görev almamasına rağmen yakın temasın engellenmesinde görev alırlar (Williams ve Gibbons, 1972).

2.3.4. IgE

IgE'ler sığır kolostrumunda bulunur ve kolostrumun alınmasıyla yavruya geçer. Derinin sensitizasyonunda etkin rol üstlenirler (Butler, 1983). Ayrıca kolostrum aracılığı ile alınan IgE bağırsak yollarında görülebilecek parazitlere karşı direnç sağlar (Thatcher ve Gershwin, 1989).

2.4. Telomer

Hücrelerin 1960 yılına kadar sınırsız bir şekilde bölünebileceği düşünülüyordu (Hayflick, 1997). Ancak invitro ortamlarda yapılan çalışmalar hücrelerin sınırsız çoğalmadığını, 40-80 civarında olacak şekilde sınırlı bölündüğünü göstermiştir (Awaya ve ark., 2002). Hücre bölünmesinde telomerler hemen hemen 50-150 baz çifti yitirirler (Reddel, 2003).

Telomerler, üzerinde yapılan çalışmaların ilk örneklerine 1930'lu yıllardan itibaren rastlanılmıştır (McClintock, 1939). Herman J. Muller, *Drosophila melanogaster*'e X ışını göndermiş ve yaptığı çalışmalar sonucunda kromozom yapısındaki değişimleri ve değişimlerin sıklığını incelemiştir (Greider ve Blackburn, 2009). Kromozomların uç kısımlarında inversiyon ve delesyonların daha az görüldüğünü, kromozomal uç kısımların daha kararlı olduğunu tespit etmiştir (Greider ve Blackburn, 2009). Araştırmalarında ayrıca kromozomların kırık terminal bölgelerinin daha basit bir şekilde birleştiğini gözlemlemesinin yanında normal kromozomlarda bulunan telomerlerin kararlı olduğunda gözlemlemiştir (Blackburn, 1991). Müller, Latince uç anlamına gelen 'telos' ve bölüm anlamına gelen 'meros' kelimelerini birleştirmiş ve 'telomer' terimini ilk kez kullanmıştır (Greider ve Blackburn, 2009).

Elizabeth Blackburn tarafından tek hücreli bir mikroorganizma olan *Tetrahymena*'nın 1978 yılında telomer DNA'sı tekrar dizileri incelenmiştir. Araştırmada bu tekrar dizilerinin TTGGGG olduğu gözlenmiştir. Yapılan başka çalışmalarda 6'lı tekrar dizilerinin türe göre farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Örneğin insanda TTAGGG'dir (Blackburn, 1991; Kim ve ark., 1994). Yapılan bu çalışmaların neticesinde kromozomların stabilitesi için kromozomların uç kısımlarında işlevsel bölgelerin var olduğu ve genomik stabilitenin sağlanmasına katkı sağladığı ortaya koymuştur (Aubert ve Lansdorp, 2008).

İlk kez 1973 yılında her replikasyon sonunda hücrelerin terminal uçlarından yaklaşık 100 baz çifti DNA yitirildiği ve bunun sonuçları arasında hücresel yaşlanmanın olduğu Olovnikov adlı araştırmacı tarafından ortaya atılmıştır (Kavalier

ark., 1998). Telomer boylarının uzunluğuna; telomeraz enzim aktivitesi, hücre bölünmesi ve çevresel faktörler etki edebilir (Lin ve ark., 2010). Telomerazlar, embriyonik kök hücreler, kanser, germ line hücreler (sperm, yumurta), tek hücreli ökaryotlarda genel olarak bulunurlar (Long ve ark., 2005).

Telomerler spesifik karakterde heterokromatin yapılarıdır ve çok sayıda TTAGGG dizisi içerirler (Muller, 1938). Ligazlara ve ekzonükleazlara dirençlidirler (Metzger ve ark., 2009). Nükleer yapışmada, kromozom uçlarının replikasyonlarının tamamlanmasında, kromozom uçlarının birbiriyle karışmasını veya kromozomların iç bölgeleriyle etkileşim vermelerini önlenmesinde görev alırlar. Kromozomun stabilitesinin sağlanmasında gen ekspresyonunda ve tümör oluşumunda telomerler rol oynarlar (Sun ve ark., 1999). Telomerler uçlarında telomerik DNA bulundurur (Kalmbach ve ark., 2013). Tekrar eden dizilerin meydana getirdiği DNA kısımlarıdır (Muller, 1938). Bu özellikleriyle başka DNA dizilerinden işlevsellik ve yapı bakımından ayrılırlar (Pfenning ve ark., 2008; Anchelin ve ark., 2011). Telomerik DNA dizileri, fonksiyon ve yapı bakımından genomik DNA dizilerinden farklıdır (Muller, 1938; Henderson ve ark., 1988). Uzunlukları farklı kökenden kaynaklanan hücrelere ya da canlılar arasınada değişir. Farelerde uzunluğu 150 kb'a kadar olabilirken insanda uzunluğu 3-20 kb arasındadır (Long ve ark. 2005). Her bir insanda toplamda 92 telomer bulunur. Her bir kromozom her iki ucunda telomer bulundurur (Colgin ve Reddel, 1999). Telomer uzunlukları, insan somatik hücrelerinde hücrelerin çoğalmasına, yaşa ve organ dokusuna göre 5-20 kb'a kadar farklılaşan heterojen bir yapı gösterirler (Wright ve Shay, 2005).

Telomerler iki ana görev üstlenmişlerdir. Bunlardan ilki uç bölgelerinin kromozomun iç bölgeleriyle tepkime vermelerini önlemek veya terminal kısımların birbirleri ile karışmasını engellemektir. Telomerlerin ikinci görevi ise kromozomların terminal bölgelerinin replikasyonlarını neticelendirmesinde işlevsel rol oynamaktır (Blasco, 2005). Ayrıca kromozom yapısının korunması ve kromozomun stabilitesinin sağlanmasında yer alırlar (Muller, 1938; Henderson ve ark., 1988). Bu stabiliteyi kromozomal uçları terminal DNA degradasyonuna, rekombinasyona ve füzyona karşı koruyarak sağlarlar (Blackburn, 2001). Tümör oluşumu, nükleer yapılanma, yaşlanma, gen ekspresyonu, hücre bölünmesi ve replikasyonda görev alırlar (Muller, 1938;

Henderson ve ark., 1988). Kromozomları çekirdeksel bozulmalardan korurlar ve füzyondan uzak tutarlar (Wong ve Collins, 2003). Bu da kromozom bütünlüğünün korunmasını sağlar (Metzger ve ark., 2009). Telomerik bölgeler küme şeklini alarak hücrenin mayoz bölünmesinde, ilk profazın leptoten aşaması boyunca kromozomların durum ve pozisyonlarının korunmasında ve yine kromozomlarının nükleus membranına tutunmasında aracılık eder (Muller, 1938; Henderson ve ark., 1988).

Telomerler üzerinde yapılan çalışmalarda telomerlerde G4-DNA yapıları bulunmuştur. Guanin içeriği olarak zengin olan G4-DNA, nükleik asit dizileridir. G-kuadropleks (G-tetrad ya da G4-DNA) olarak adlandırılan guaninlerden meydana gelen 4 zincirli bir yapıdır. Telomeraz işlevini durduran ve G-4-DNA'yı stabilize edebilen yapılar kanser tedavisinde önem kazanmaya başlamıştır. Bu yapılar telomerlere, telomeraz enziminin ulaşmasını engellemektedir. Bunuda G-4 kuadropleks yapısını stabilize ederek yaparlar (Smith ve Johnson, 2010).

Telomerler hücrelerin yaşlanma ve çoğalma kapasitelerini yöneten bir fonksiyona sahiptir (Kalmbach ve ark., 2013). Telomer DNA'sı esas telomerik bölge ve subtelomerik bölge olarak iki bölümden meydana gelir. Esas telomerik bölge kromozomun ucunu oluşturan bir bölgedir ve subtelomerik bölgeden sonra gelir. Kromozomun ucundan önce çift sonra tek dal halinde ilerler. Esas telomerik kısım 5' uçtan 3' uca doğru TTAGGG tekrarını içerir (Nelson ve cox 2005). Germ hücrelerinde 10 kb, somatik hücrelerde 5 kb genel olarak 5-15 kb uzunluğundadır (Henderson ve ark., 1988). Subtelomerik kısım, çift dal halindedir ve heterojen yapıda DNA tekrarları içerir. İnsan telomerlerinde subtelomerik bölge 40-60 kb uzunluğunda olup bu kısım 5' uçtan 3' uca doğru TTGGG ve TGAGGG tekrarından oluşan 30-45 kb'lık uzun bloktan meydana gelir. Sonrasında TTAGGG tekrarı olan bir ara kısım 10-15 kb uzunluğunda TTGGGG ve TGAGGG tekrarı kapsayan bir kısa bloktan oluşur (Nelson ve cox 2005). Bu bölgenin DNA tekrar dizileri heterojen ve dizilerin uzunluğu değişkendir. Memelilerdeki subtelomerler ile telomerler, gen mevcudiyeti ve sekans birleşimi bakımından perisentromerik bölgeyle benzerlik gösterir. İkisinde çok miktarda DNA tekrar içeriği ile karakterizedir. Telomerler gen barındırmazlarken, perisentromerik bölgeye benzer şekilde subtelomerik bölge genden fakirdir (Lundblad ve Wright, 1996).

Yapılan çalışmalarda, farelerde subtelomerik DNA'nın metillenebildiği görülmüş, fare subtelomerik ve telomerik kromatinlerin histon modifikasyonları içerdiği tespit edilmiştir. Subtelomerik DNA metilasyonundaki değişiklikler ya da telomerik kromatineki histon modifikasyonları telomer uzunluğundaki düzensizlik ile ilişkili olduğu görülmüştür (Blackburn, 1991). Telomer yapıları genelde aynı olmakla birlikte farklı tekrar dizileride tespit edilmiştir. Örnek olarak tek hücreli olan *tetrahymena*'da TTGGGG dizisi bulunurken omurgalılarda TTAGGG dizisi bulunmaktadır (Riethman ve ark., 2001). Telomerik DNA'nın hücre döngüsüne bağlı olarak kaybı ve tekrar geri kazanılması (telomeraz enzimi aracılığı ile) söz konusudur. İnsanlarda bulunan somatik hücrelerin hücre sikluslarında yeniden sentezlenen telomerik DNA miktarı, kaybedilen telomerik DNA miktarından azdır (Henderson ve ark., 1998). Doğrusal kromozomlarda eşlenme yönü yeni oluşacak dizilerde 5'ten 3'e yönlüdür. Her iplikte eşlenmenin başlayabilmesi için bir RNA primerine gereksinim vardır. DNA eşlenmesi sonunda RNA primeri ortamdan çekildiğinde kromozom ucunda eksik bir bölge kalır. Telomer bu noksanlığın yapısal gen materyallerine ulaşmaması için bir çeşit koruma rolü üstlenir. Kısa bir telomer segmenti her kromozomun sonunda hücre bölünmesiyle bir sınıra kadar gelir hücre döngüsünün sonlanmasına kadar kısalır. DNA eşlenmesinde kaybedilen telomerik diziler telomeraz enzimi ile geri kazanılabilir (Pfennig ve ark., 2007). DNA'ların kendini eşlemesi sırasında kesintisiz ve kesintili sentezlenen dizilerin her ikisinde de polimerizasyonun başlayabilmesi için bir RNA primerine gereksinim vardır. Bu dizideki her bir Primer-DNA kompleksine okazaki parçacığı denir. Kesintisiz dizilerde ise bir tane primer yeterli olurken. Kesintili dizide üretilen her DNA bölümü için bir primere gereksinim vardır (He ve ark., 2004).

Hücre siklusunda DNA'nın çift sarmallı zincirleri birbirlerinden ayrılarak DNA polimeraz sayesinde hücrenin eşlemesi gerçekleşir. Ancak DNA polimeraz enzimi replikasyonu yalnızca 5'-3' yönünde yapabilmektedir. Bu sebeple 3'-5' yönündeki kalıp DNA zincirinde eşlenme kesintili olmayan biçimde meydana gelirken gerçekleşen bu mekanizmaya zıt olarak 5'-3' yönünde konumlanan, tamamlayıcı DNA dizisi kesintili bir şekilde RNA primerleri yardımıyla sentezleni kesintili bir biçimde oluşan DNA dizileri birleştirilir. Fakat 5'-3' ekzonukleaz ile son üretilen RNA primeri

uzaklaştırıldığında DNA polimeraz enzimi ulaşılabilir, 3'-OH grubu bulunamadığı için nükleotid ilave edilemez ve telomer kısalmır (Flanary ve Streit, 2003). Kesintisiz sentezlenen dizilerde bir sorun olmadan eşlenme tamamlanır. Ancak kesintili sentez okazaki parçacıklarının DNA ligazla biraraya gelmesiyle biter. Kesintili sentezlenen dizilerde kromozomun sonu ile okazaki parçacığı arasındaki boşluğu kapsayacak bir DNA parçası bulunmamaktadır. Bu sebeple meydana gelen olaya replikasyon sonu problemi denir. Replikasyon sonu problemi, kromozomun uç kısmının eşlenememesi ve telomer bölgelerinin kısılmasıyla meydana gelir (Riethman ve ark., 2004). DNA polimerazın hücre bölünmesinde kesintisiz zincirin 3'ucunu tamamını replike edememesidir (Greider ve Blackburn, 1996). Replikasyon sonu problemi nedeni ile her hücre bölünmesinde 50-200 nükleotitlik kısım telomerik uçlardan kayıp olmaktadır. Bu kayıplar nedeni ile zamanla telomerik kısıalma gerçekleşir. Telomerik kısılmanın hücrenin yaşlanmasına ve canlılığının kaybolmasına neden olduğu kabul edilir (Wright ve Shay, 2005; Blasco, 2005).

T-loop (Telomer loop) yapısı telomerik uçların normal replikasyon yapısı ile kopyalanamayıp geriye doğru kıvrılarak kement şeklini almasıdır (Wai, 2004). Guanin zengini sarkan tek ipliğin çift iplikli telomerin içine girmesiyle meydana gelir (Codd ve ark., 2013). Telomeri meydana getiren hekzanükleotid dizileri, T-loop olarak isimlendirilen 100-200 arasında nükleotit içeren kement benzeri ilmek şeklindedirler. Çok miktarda guanin içerirler tek iplikli TTAGGG dizileriyle son bulurlar (Bayne ve Liu, 2005).

D-loop (Displacement loop) yapısı guanince zengin tek iplikli 3'ucu, 5'ucunda bulunan çift zincirli telomer tekrarına bağlanmasıyla oluşur. T-loop/D-loop yapısına bazı telomerik proteinler doğrudan ya da dolaylı olarak bağlanır. (TPP1, POT1, Rap1, TIN2, TRF2 ve TRF1) Şelterin kompleksi ya da "telesom" olarak adlandırılan yapı ise bazı telomerik proteinlerin T-loop/D-loop yapısına bağlanmasıyla oluşan spesifik yapıya denir (De Lange, 2005). TIN2 (TRF1 etkileşimli protein2), POT1 (Telomer koruma proteini1), TRF1 ve TRF2 (Telomerik tekrar bağlanma faktörleri 1 ve 2) ve Rap1 (Represör aktivatör protein1)'in telomer kompleksinde bulunan proteinlerdendir ve bir bölümü telomer çift ve tek dal uç bölgesini çevreler. Telomerin boyunun kontrolünde görev alırlar ve telomeri yıkılmaktan T-loop oluşumuna katkı sağlayarak

korurlar (Martínez ve Blasco, 2010). Şelterin kompleksi, DNA'nın hasarlı veya kırık olarak tanınmasına mâni olur. Bu yapıda görülebilecek olumsuzluklar genomik kararsızlığa ve telomerlerde işlevsel sorunlara yol açmaktadır (Herbert, 2009). DNA polimeraz, DNA'nın replikasyonunun başlaması için gerekli olan primerlerin yıkılınmasıyla meydana gelen boşlukları dolduramaz. Bu sebeple DNA'nın her replikasyonunda telomerin 5'ucu kısalır (Reddel, 2000; Makarov ve ark., 1997).

Telomerler DNA'nın her replikasyonunda kısalır ve bir süre sonra kritik kısalığa ulaşarak DNA hasar uyarısı oluşmasıyla ve replikatif yaşlanma meydana gelir işte bu aşamaya "M1 aşaması" denir. M1 noktası, pRB ve p53 yolları aracılığı ile kontrol altında tutulur. Kontrol altında tutulan M1 noktasında hücre ölümü (fizyolojik yaşlanma) ya da hücre çoğalmasının durdurulması meydana gelir. M2 noktası; M1 noktasında hücre ölümü ya da hücrenin çoğalması kontrol altına alınamazsa hücreler çoğalmaya devam eder böylece telomerler terminal kısalığa ulaşır. İşte bu aşamaya kriz evresi başka bir tanımla "M2 noktası" denir. M2 noktasında, uç uça füzyon veya kromozomal instabilite meydana gelerek karsinogeneze veya hücre ölümüne sebebiyet verir (Wai, 2004). Telomerazı reaktif edebilen hücreler, sınırsız proliferasyon yeteneğine sahip olurlar. İmmortal fenotip kazanılması veya sınırsız replikatif özellik kanserojenik hücrelerin sahip olduğu özellikler arasında yer alır (Shay ve Wright, 2007; Shay ve Wright, 2005). Telomerik DNA'lar ile bu problem çözülür. Telomerik DNA'lar ökaryotik kromozomların son kısımlarında bulunurlar ve özel bilgi içermezler. Telomer dinamiği; Telomerik DNA'nın hücre döngüsüne bağlı olarak kaybı ve yeniden kazanılması işlemine denir. Telomerler bu özellikleri bakımından kromozomların diğer bölgelerinden ayrılırlar. İnsan somatik hücrelerinde telomer dinamiğinin negatif olmasının nedeni her hücre döngüsünde yeniden sentezlenen telomerik DNA miktarının kaybedilen telomerik DNA miktarından daha az olmasından kaynaklıdır. DNA eşlenmesi sonu problemini dengeleyecek moleküler mekanizmaların olmaması durumunda, somatik insan hücrelerinde her hücre eşlenmesinde 50-200 nükleotidlik kayıp görülmektedir ve hücreler 40-70 PD (Population Doubling: Hücre bölünmesi) sonrasında yaşlanmaktadır (Cong ve ark., 2002). Telomer uzunluğu tek bir organizmanın farklı dokularında hatta aynı organizmanın tek bir hücre tipi içerisinde dahi farklılık gösterebilir. Telomerik tekrar

dizilerinin sayısı türden türe farklılık gösterebilir. Örneğin bazı farelerde 100 kb iken insanda telomer uzunluğu 8-12 kb'dir (De Lange ve ark., 1990; Downs ve ark., 2012). Telomerler, normal kromozom yapısının fonksiyonu ve yapısının korunması için gerekli olan kromozomların kısa ve uzun kollarının uç kısımlarında yer alan yapılardır. İnsanda moleküler yapısının 1-12 kb uzunluğundaki TTAGGG tekrarı olduğu tespit edilmiştir (Kipling, 1995; Greider, 1996; Harley, 1997).

DNA molekülündeki Watson-Crick yapılanmasından farklılık gösteren telomer yapısının paketlenmesi için olması gereken proteinler de kendine özgüdür (Kipling, 1995). Telomeraz, ribonukleoprotein yapısında revers transkriptaz bir enzimdir. 9-30 nukleotidden oluşan bir RNA yapısı telomerler için kalıp görevi üstlenir. Telomeraz enzimi lineer DNA'ların uçlarında bu kalıplardan faydalanarak telomerik DNA üretimini gerçekleştirir. DNA polimeraz enzimi hücre bölünmesi sırasında kromozomun uç kısımlarını replike edemez. Telomerik DNA bölgesinin sentezini telomeraz enzimi gerçekleştirir (Kipling, 1995; Harley, 1997). Hücre bölünmesinin G1 aşamasında sağlıklı hücrelerde p53 ve pRB tümör supresör genler hücreyi kontrol altında tutar. Bu aşamada supresör genlerin mutasyonu ya da onkogenlerin aktifleşmesi gerçekleşirse hücre kontrolsüz biçimde bölünmeyi sürdürür ve telomerler kromozom bütünlüğünü koruyamayacak kadar kısalır. Bu aşamada bazı hücrelerin ölümsüz hale geldiği çoğu hücreninde öldüğü görülmüştür (Shall, 1997; Shay ve Wright, 2001).

Yapılan çalışmalara telomer kısalması ile hücre immortalizasyonu ve replikatif hücre yaşlanması arasında ilişkiler gözlenmiş olup bu konularla ilişkili olarak in vivo kanser ve yaşlanma ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. DNA'da bulunan yapışkan uçların rastgele birleşmesi DNA eşlenmesinde bozukluklara yol açabilecek önemli faktörlerden biridir. Telomerler bu olayın gerçekleşmemesi için kromozomları korur. Tümörün meydana gelmesinde, kromozom bütünlüğünün bozulması telomerlerin kısalması neticesinde telomerlerde fonksiyon bozuklukları görülmesiyle gerçekleşebilir. Bu olanlar sonucunda hücresel krizin gerçekleştiği düşünülmektedir (Maser ve DePinho, 2002). Yapılan bazı çalışmalarda telomer boyunun hücrelerin çoğalma özellikleri üzerine etkileri görülmüştür. Tümör dokusundan ve aynı organda yer alan tümör içermeyen dokudan alınan örneklerde telomer boyu incelendiğinde

tümör olmayan dokuda telomerin boyu tümör olan dokuya göre daha uzun olduğu tespit edilmiştir (Hastie ve ark., 1990; Kipling, 1995). Lösemi hastalığı bulunan insanlarda yapılan gözlemlerde ise akut lösemilerde ya da kronik lenfoblastik lösemide geç evrede ve kronik myeloid lösemilerde telomer uzunluklarının kısa olduğu gözlenmiştir (Shay ve ark., 1996).

Telomerlerin yaşlanma ile ilişkileri birçok çalışmaya konu olmuştur. Telomeraz aktivitesi olmadan in vitro kültürlerde hücreler, telomer boyları azalarak hemen hemen 40-100 bp oluncaya kadar bölünürler. Telomer boyları bu aşamalara ulaşınca hücre döngüsünü kontrol eden bölümler uyarılır ve hücre siklusu G1 fazında durur (Hornsby, 2002). Hücre sikluslarının neticesinde telomerlerin boyu belirli aşamaya kadar kısaldıklarında ilgili bölgeler tarafından hücre siklusu G1 fazında durmasıyla replikatif yaşlanma gerçekleşmiş olur. Hücreler bu aşamada halen metabolik olarak aktiflerdir ve uygun ortamlarda birkaç yıl yaşayabilirler (Marcotte ve Wang, 2002). Replikatif yaşlanmış hücreler belli karakteristik özellikler gösterirler. Geniş ve yassı bir morfolojiye sahip olurlarken düşük pH derecesinde β galaktozidaz aktivitesi ve lipofuskin birikmesi önemli yaşlanma belirtilerindendir (Hwang, 2002). Telomer kısalması insanlara en önemli in vitro ve in vivo yaşlanma göstergelerinden kabul edilir (Cherif ve ark., 2003) Yaşlanmayla telomer boyutu arasındaki ilişkiyi inceleyen birçok çalışma günümüze kadar yapılmıştır (Frenck ve ark., 1998; Iwama ve ark., 1998; Mondello ve ark., 1999; Friedrich ve ark., 2000).

R.W. Frenck ve arkadaşları tarafından 1998 yılında yapılan bir çalışmada kan örneklerinden, telomer uzunlukları çalışılmış olup bu çalışmada yeni dünyaya gelmiş yavruların göbek kordlarından ve onların ebebeyinleri olan anne-babalarından, ebebeyinlerin anne-babalarına ve onların da ebeveyini olan büyük anneanne ve büyük babalarından örnekler toplanmıştır. Bu çalışmanın sonunda vücut hücrelerinde telomer kısalma hızının her zaman aynı olmadığı gözlenmiş olup telomer kısalmasının en az 2 aşamada olduğu bildirilmiştir. İlk aşamanın doğumdan 4 yaşına kadar olan hızlı telomerik kısalma olup 2. Aşama olarakta ilerleyen yaşla birlikte meydana gelen kademeli kısalma olduğu bildirilmiştir (Frenck ve ark., 1998).

Friedrich ve arkadaşları tarafından 2000 yılında yapılan bir çalışmada ise 95 ile 73 yaşları arasındaki bireylerin lökositlerden, sinovial ve deri dokularından elde edilen hücrelerde telomer uzunlukları incelenmiştir. Çalışmaya katılan bireylerin yaşlarıyla deri ve lökosit hücrelerinin telomer uzunluklarının ters orantılı olduğu görülmüştür. Ayrıca yaş ilerledikçe telomer boylarının kısaldığı gözlenmiştir. Aynı organizmanın farklı dokularından elde edilen telomerlerin boylarının doğrusal korelasyon gösterdiği de gözlenmiştir (Friedrich ve ark., 2000).

Slagboom ve arkadaşları tarafından 1994 yılında yapılan bir başka çalışmada dizigot ve monozigot olan ve yaşları 2 ile 95 arasına değişen çiftlerde bir çalışma yapılmış bu çalışmaya göre telomer kısalması 31 bp/yıl olarak tespit edilmiş ve telomer uzunluğunun kalıtılabilir ölçüsünün %78 olduğu gözlenmiş olup çalışmadan yola çıkılarak araştırmacılar telomer uzunlukları arasındaki farkların aynı yaştaki bireyler arasında genetik açıdan belirlenebileceğini belirtmişlerdir (Slagboom ve ark., 1994).

Kinugawa ve arkadaşları tarafından 2000 yılında yapılan bir çalışmada telomeraz aktivitesi ile overin fonksiyonel yaşı arasında bağlantının olduğu ve primordial folikül sayısının azalmasının overlerdeki telomeraz aktivitesiyle ilgili olduğu ve telomeraz aktivitesinin overlerin fonksiyonel yaşının tespitinde kullanılabileceği gündeme getirilmiştir (Kinugawa ve ark., 2000). Telomer boyu, erken over yaşlanması olan bireylerde normal bireylere göre daha uzun olduğu görülmüştür (Dorland ve ark., 1998).

2.5. Telomeraz

Telomeraz enzimi, Greider ve Blackburn'un yaptığı çalışmalar neticesinde tanımlanmıştır. İlk kez *tetrahymena* da gösterilmiştir. Akabinde Morin çalışmasında insanlardaki HeLa hücrelerinde telomerazı göstermiştir (Gorham ve ark., 1997).

Telomer deoksिनükleotidil transferaz veya telomer terminal transferaz olarak da isimlendirilebilir (Nugent ve Lundblad, 1998; Meyerson, 1998). Kromozomun uçlarında bulunan TTAGGG tekrarının üretiminden sorumludur. Ribonükleoprotein yapısında spesifik bir DNA polimerazdır (Zheng ve ark.,1997). Telomeraz enzimi,

kendi ürettiği hegzamerik dizi tekrarlarını telomerlerin uçlarına ekler (Long ve ark., 2005). Yalnızca telomeri etkilemekle kalmaz bağışıklık ve hücre fonksiyonlarını da etkiler (Effros, 2011; Weng ve ark., 1997). Yapılan bazı çalışmalarda bağışıklık sistemi üzerinde de kısa ve uzun vadeli etki ettiği gözlenmiş ve telomer kısalmasının enfeksiyonlara karşı savunmada azalmalara sebep olduğu bildirilmiştir (Miller, 2000). Normal somatik hücrelerde bulunmayan bu enzim ölümsüz kanser hücrelerinde aktif hale gelmektedir. Erişkin kök hücrelerinde ve embriyonik hücrelerinde de aktiftir (Gorham ve ark., 1997). Birçok somatik hücrede telomeraz enziminin etkinliği yok olurken endometrium, epidermis, intestinal kriptler, kemik iliği, aktive lenfositler, germ hücreleri, servikal epitel, özofagus epiteli, saç folikülleri, hematopoetik kök hücrelerinde telomeraz enziminin aktivitesi az miktarda devam etmektedir (Burger ve ark., 1997; Greider, 1998).

Telomeraz aktivitesi embriyo aşamasının ilk haftalarında birçok hücrede gözlenirken daha sonra birçok hücrede zamanla azalır (Hug ve Lingner, 2006; Harley, 2005). Telomeraz enziminin kendi kalıp RNA molekülünü enzimin önemli bir parçası olarak taşır. Bu RNA molekülünün kalıp olarak kullanılmasıyla telomeraz enzimi tekrarlanan uç tekrarların çoklu kopyasını meydana getirebilmekte ve buna dayanarak bir DNA kalıbı olmadan telomerleri koruyabilmektedir (Edo ve Andres, 2005). Bu enzim, 5'-TTAGGG-3' tekrar dizisini hücrenin replikatif aşamasında telomerin son kısmına ekler bu eklenme 5'-TTAGGG-3' tekrar dizisinin kromozom uçlarındaki kaybını dengeler. Hücre plazma zarında özel mitojen ve antijen reseptörlerinin uyarılmasıyla kayda değer miktarda artan telomeraz etkinliği gözlenirken, dinlenen lenfositlerde az miktarda telomeraz etkinliği gözlenir (Liu ve ark., 2003). Yapılan çalışmalar neticesinde telomeraz etkinliği düşük olan normal hücrelerde telomerik tekrar dizileri korunmakta olup hücreler böylece kendini yenileyebilmektedir (Blackburn, 2005). Az miktardaki telomeraz etkinliği neticesinde bu hücreler immortal hücrelere dönüşmeden çoğalma özelliklerini devam ettirebilmektedirler. İmmortal kanser hücrelerinde telomerazlar tekrardan etkin olmaktadır (Gorham ve ark., 1997). Telomer aktivitesi ve telomer uzunluğu insanlarda görülebilecek hastalıkların patobiyolojisinde etkilidir (Blasco, 2005).

Telomerazın 3 bileşeni tespit edilmiştir. Bunlar;

1-TERT yani Telomeraz katalitik alt birim

2-TR yani Telomeraz RNA alt birimi

3-TP 1 yani telomeraz protein komponentidir.

Telomeraz Revers Transkriptaz (TERT), ters transkriptaz etkinliğine sahip telomeraz kısmıdır. TR'in kalıp olan bölümü telomere bağlanırken komplementer kısımlar kalıp esas alınarak telomerazın katalitik alt birimi tarafından eklenir. Bu da telomerin uzamasını sağlar (Edo ve Andres, 2005). Telomeraz, bir RNA alt birimi olan TERC protein yapısında hTERT ve spesifik proteinlerden meydana gelir. TERC; telomerlerin uzamasında kalıp olarak kullanılır (Gomez, 2012; Wyatt ve ark., 2010). Telomer Revers Transkriptaz, canlıdan canlıya genel olarak aynı olmakla birlikte bazı farklılıklar gözlenebilir. İlk defa *Euplotes aediculatus*'dan p123 olarak elde edilmiştir (Jarstfer ve Cech, 2002). 'hTERT'in canlıdan canlıya adlandırılması değişebilmektedir örneğin köpeklerde dogTERT (Nasir, 2004), tavuklarda chTERT (Delany ve Daniels, 2004). İnsanda hTERT (Thewissen ve ark., 2005). Farelerde rTERT olarak isimlendirilir (long ve ark., 2005). 'hTERT'i kodlayan gen ilk defa 1997 yılında klonlanmış ve 7 ekson barındırdığı gözlenmiştir. İlk ekson telomeraza spesifik olup diğer eksonlar başka revers transkriptazdakilerle benzerlik gösterirler (Colgin ve Reddel, 1999). 'hTERT', RNA molekülünden DNA üretiminde katalitik sorumluluk üstlenen bir proteindir (Gomez, 2012; Wyatt ve ark., 2010). Diploid insan hücrelerinde hTERT geni 5. Kromozomda tek kopya olarak bulunmaktadır. 'hTERT' geni insanda 15 intron ve 16 ekson barındırmaktadır. Hemen hemen 40 kb'dır. Büyük bir proteindir (Rojas ve ark., 2012). 'hTERT'i kodlayan genetik materyalin ekspresyon düzeyiyle telomeraz aktivitesi arasında kuvvetli bir korelasyon gözlenmesi, hTERT'in telomeraz aktivitesi regülasyonundan sorumlu olabileceğini akla getirmektedir (Colgin ve Reddel, 1999; Zakian, 1995). Köpeklerde sekans karakterizasyonu ve katalitik alt birimli telomeraz izolasyonu ile ilgili çalışmalarda hTERT ile dogTERT arasında yapısal benzerlikler gözlenmiştir (Angelopoulou ve ark., 2008).

TR, yani ‘Telomeraz RNA’ bir alt birim olup diğer ters transkriptazlardan kendi RNA alt birimini kalıp olarak kullanmasıyla ayrılır. Telomeraz RNA (TR), RNA polimeraz II yardımıyla transkripsiyon geçirir ve 5’ucuna kısa mesafe kala telomer DNA’sına tutunma ve reverstranskripsiyon amacıyla kalıp olarak kullanılır (Angelopoulou ve ark., 2008). ‘hTR’, insanlarda telomeraz RNA alt birimidir. ‘hTR’ mRNA ekspresyonuna birçok çalışmada normal hücrelerde ve kanserli hücrelerde rastlanılmıştır. Kanser hücrelerinde daha fazla gözlenmiştir. Kimi hücrelerde telomeraz ekspresyonuna rastlanmaz bu hücrelerde hTR’nin görevi tam olarak bilinmemektedir (Rojas ve ark., 2012).

TP1 yani Telomeraz protein komponenti, regülatör bileşen olarak telomeraz enziminde görev alır ve özel olarak telomerazın RNA alt birimini bağlar. Telomerler üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda telomer pozitif ve telomer negatif hücrelerde TP1 mRNA ekspresyonu gözlenmiştir. Bu sebeple bu bileşenin telomeraz aktivitesinin yönetilmesinde işlevsel olmadığı düşünülmektedir. Fakat Nakayama ve ark. 1998 yılında yaptıkları bir çalışmada TP1 proteininin post-translasyonel modifikasyonunun, enzimatik işlevlerin optimizasyonunda görev üstlenebileceği bildirilmiştir (Nakayama ve ark., 1998).

Telomere bağlanan faktörler; Telomerik DNA tekrarına tutulan diziye özel protein yapılarıdır. Telomerik stabilitenin gerçekleşmesinde ve telomer uzunluklarının düzenlenmesine katkı sağlarlar (Cherif ve ark., 2003).

Large ve ark. 1997 yılında yaptıkları bir çalışmada TRF1 ve TRF2 proteinlerini in vitro insan hücrelerinde tanımlamışlardır. Bu proteinler “TTAGGG” dizi tekrarlarına bağlanır. TRF1, telomer uzunluğunun düzenlenmesinde ve telomeraz enziminin telomerlere bağlanmasına katkı sağlar. Ayrıca TRF1, çift zincirli DNA’da bulunan telomerik tekrarlara bağlanır. TRF1, TTAGGG dizisini memeli telomerlerinde özel olarak tanır. Bu sebeple TTAGGG tekrarına bağlanan faktör olarak bilinir (Cherif ve ark., 2003). Telomeraz pozitif ve negatif hücrelerde RT-PCR ile yapılan çalışmalarda TP1 mRNA ekspresyonu gözlenmiş olması enzim aktivitesinin kontrolünde mühim olmadığını akıllara getirmektedir (Nakayama ve ark., 1998; Horikawa ve ark., 1998). TRF1’e kıyasla TRF2; amino ucunda daha fazla bazik

aminoasit barındırır ve telomerik tek iplikçiği degradasyona karşı korur. TRF2, DNA tamir aktivitelerinden bu kısmı korur. Bu sebeple kromozomların uç uca birleşmelerini önler ve telomerleri korur (Cherif ve ark., 2003). DNA tamir proteinleri, tamir yollarında rol alır ve telomerlere komşudurlar. TRF2'lerin DNA tamir proteinleriyle etkileşim içinde oldukları düşünülmektedir (Iwama ve ark., 1998).

Katalitik alt sınıf olan 'hTERT' ters transkriptaz etkinliği gösterir (Collins, 2006; Cong ve ark., 2002). Katalitik alt birimini kodlayan geni 5. Kromozomu (5p15.33) içermektedir ve yedi ekson içerir. Yalnızca ilk ekson telomeraza spesifiktir. Diğer eksonlar ise revers transkriptazdakilere benzer (Nakayama ve ark., 1998; Horikawa ve ark., 1998). Tüm hücrelerde telomerazın 'TR' alt sınıfı bulunur fakat hTERT alt sınıfı ise sadece ölümsüz ve malignant hücrelerde eksprese olmaktadır (Chiang ve ark., 2004). 'TERT', telomerazın katalitik alt birimidir ve yeni üretilen telomerik dizinin 3' yönünde kayarak komplementer GGTTAG tekrar dizilerini üretir ve 3' ucuna ilave eder. Akabinde DNA polimeraz enzimi, telomeraz enziminin ürettiği bu diziyi kalıp olarak kullanır ve karşı zinciri bütünler. Bunun sonucunda 5' ucundaki boşluk doldurulmuş olur (Greider ve Blackburn, 1985; Sun ve ark., 1999). Birçok insan somatik hücresinde, ilk embriyonik dönemde hTERT'ün transkripsiyonel supresyondan ötürü telomeraz enzim aktivitesi yok olmakta ve replikatif yaşlanma telomer kısalmasıyla bağlantılı bir şekilde replikatif yaşlanma oluşmaktadır (Hiyama ve Hiyama, 2007). Telomer uzunluğunun muhafaza edilmesi yaşlanmayla görülebilecek hastalıklardan kaçınmak ve hücresel yaşlanmadan sakınmak için yeterli olabilir (Hug ve Lingner, 2006). Telomeraz, 1-6 adet hTR yapısında 5'-CUAACCCUAAC-3' dizisi barındırır ve telomer DNA'sına komplementer olan bu dizilerden 5'CCUAAA-3' dizi tekrarını barındıran bir kısmı sentez esnasında kalıp olarak işlev görmektedir (Horikawa ve ark., 1998; Nakayama ve ark., 1998).

Ökaryotik hücrelerin replikasyonunda DNA polimeraz enzimi DNA sentezine hemen başlamaz DNA replikasyonun başlaması için 3'-OH grubunu sağlayan 8 ile 12 arasında baz içeren bir RNA primerine ihtiyaç vardır bu primer DNA polimerazın bağlanmasını sağlar. Fakat RNA primerinin mevcudiyetinde DNA polimerazı hem kesintisiz hemde kesintili sentezlenen zincirde okumasını devam ettirebilir. DNA üretimi yalnızca 5'-3' yönünde gerçekleşebildiğinden, RNA primerinin uzaklaştırılmasının akabinde yeni üretilmiş çift zincirli DNA'nın 5' ucunda 8-12 bp

civarında bir boşluk meydana gelmektedir. Meydana gelen bu boş kısım DNA polimeraz enzimi tarafından onarılamaz. DNA'nın bu kısmı tek zincir şeklinde kalır ve molekülün stabilitesini olumsuz etkiler. Spesifik replikasyon işlevlerinin eksikliğinde her replikasyonun akabinde kromozom boylarının 30-200 bp aralığında kısalmasına ve neticede işlevsel genlerin yitirilmesine neden olur (Greider ve Blackburn, 1985).

Telomeraz etkinliği, çoğalma göstermeyen ovaryum ve sperm hücrelerinde düşüktür. Fertilizasyonu takiben arttığı yapılan çalışmalarda gözlenmiş olup telomeraz etkinliğinin gelecek jenerasyon embriyonik kök hücrelerde ve germ hücrelerinde sürmektedir (Hiyama ve Hiyama, 2007). Yüksek çoğalma kapasiteli ve kendini yenileyebilen hücreler (epidermis, intestinal epitel ve endometriyum gibi) az miktarda telomeraz etkinliği göstermektedirler (Blasco, 2005). Somatik hücrelerden, normal kök hücrelerden ya da öncü hücrelerden kaynaklı kanser hücrelerinde de telomeraz aktivitesi görülmektedir. Bu vesileyle ölümsüzlük ve kendini yenileme özellikleri gösterirler (Hiyama ve Hiyama, 2007).

2.6. Telomer, Telomeraz ve Yaşlanma

Olovkinov 1973 yılında ilk kez replikatif yaşam süresinin telomer kısalmasına bağlı olabileceğini gündeme getirmiştir. Ayrıca her hücre bölünmesinden sonra kromozomlarda bir kısalmanın gözlemlendiğini ve belli bir sınırdan sonra hücrenin artık bölünmeyerek öldüğünü bildirmiştir (Olovnikov, 1973).

Telomer boylarının azalmasına ilk önce 1961 yılında doku kültürü çalışmaları esnasında Hayflick tarafından rastlanılmıştır. Hayflick insan fibroblastları ile gerçekleştirdiği deneylerde, hücrelerin belirli bir replikasyon sayısından sonra artık replike olmadığı ancak metabolik aktivitelerini sürdürüp yaşamını devam ettirdiği görülmüştür (Ben-Porath ve Weinberg, 2004; Shay ve ark., 2001). İlk kez normal fibroblast hücrelerinin yaklaşık 50 hücre siklusundan sonra bölünme yeteneklerini kaybettiklerini bildirmiş ve buna 'Hayflick limiti' denmiştir. Limitlerine ulaşmış hücrelerin ölmediklerini ancak bölünme göstermeksizin aktif kalıp en sonunda öldüklerini gözlemlemişlerdir (Hayflick ve Moorhead, 1961).

Günümüzde geçerliliğini sürdüren telomer yapı ve işlevi ile ilgili bilgiler Harley tarafından 1990 yılında açıklanmıştır (Harley ve ark., 1990). Yapılan deneylerde olgunlaşmış hücrelerin metabolik olarak yaşamını sürdürdüğü, fakat daha fazla replikasyonun gözlenmediği ve netice olarak da hücrenin yaşamını yitirdiği gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmalar esnasında organizmanın yaşlanması ile hücresel yaşlanma arasında doğrudan bir bağlantı olduğu bilinmemekteydi. Yaşlı insanlardan alınan hücreler genç insanlara göre kültür ortamında daha az bölündüğü gözlenmiştir (Moyzis ve ark., 1998). Normal hücre replikasyonlarında telomerler bir miktar kısalırken tümör hücrelerinde telomer kısalması gözlenmemiştir. Bu durumda telomerlerin hücrede “mitotik bir saat” gibi davrandıklarını bildiren düşünceleri gündeme getirmiştir (Harley ve ark., 1990).

İnsan somatik hücreleri üzerinde yapılan gözlemlerde her hücre siklusunda telomerlerin uzunluklarının kısaldığını ve bu da hücre bölünmesini sınırlandırarak belli bir aşamadan sonra hücrenin yaşlanıp öldüğünü göstermektedir (Hayflick ve Moorhead, 1961). Zaman içerisinde hücrenin hacmi artar ve sitoplazması matlaşır. Diğer taraftan gen yapımında, nükleer yapılarda, proteinlerin yapılmasında aksamalar olurken bu hücreler metabolik olarak canlıdırlar. İnsanlardaki hücre bölünmesini kısıtlayan iki yolak bulunur. İlki p53 bağımlı (telomer bağımlı), bir diğeri stres ile uyarılan ve kısmen tanımlanmış (p16INK4A ve pRb tümör supresörlerine bağlı) yolaklardır. Genellikle bu metabolik olaylar onkogen tarafından tetiklenen yaşlılık sırasında aktif hale gelebilir. ‘p16INK4A/pRb ve p53/p21’ stres odaklı erken yaşlılığı indükleyebilir ve akabinde da bozulmuş telomer işlemleri yaşlılığı tetikleyebilir (Hastie ve ark., 1990). Disfonksiyonel telomer, belirli bir kısalığa ulaşan telomerlere denir. Disfonksiyonel telomer içeren bir hücre mortalite evresi 1 (M1) ve mortalite evresi 2 (M2) olarak iki kritik kontrol noktası içerir (Henderson ve ark., 1988). Yapılan çalışmalarda insan hücrelerinde görülen yaşlanma ve ölümün iki aşamada gerçekleştiği görülmüştür. M1 evresinde telomerler kısalır ve kromozomlar kritik seviyeye ulaşır. Bu mekanizma sonunda hücre siklusu durdurulur ve yaşlılık programı devreye girer. Replikatif yaşamın süresi M1 tarafından temsil edilir. Hücre bu aşamayı atlarsa bilhassa onkogenik transformasyonla M2 noktasına kadar telomerler kısalır (Hayflick ve Moorhead, 1961). M1 evresi, bu aşamada hücrenin yaşlanması uyarılır

ve hücre siklusu durur. Tümör inhibe edici pRb, p53 benzeri proteinlerle kontrol edilir. 'p53-p21' yolağı, hücreyi yaşlanması için uyarır. Telomerlerin kısalması aktif hale gelir. 'p53' proteini, en önemli hücre yaşlanma kontrol edicisidir. Hücreyi apoptoza yönlendirir ya da proliferasyonu kalıcı/geçici olarak durdurabilir (Henderson, 1988).

Kriz noktası "M2" noktası olarak isimlendirilir. Kriz noktasında büyük hücre mortalizasyonu meydana gelir. Büyük hücre ölümü zayıflayan telomer fonksiyonu dolayısıyla meydana gelebilir. Bu sorundan kurtulmak için telomeraz enzim aktivitesine gereksinim duyulmaktadır. Bu enzim sayesinde telomer yapısı ve uzunluğu tekrardan sağlanabilir ve sürdürülebilir. M2 noktasında ortaya çıkan hücreler sonsuz olarak çoğalabilirler (Hayflick, 1961). Somatik hücrelerin telomerlerinde kısalmanın ilerlemesiyle M1 evresinden M2 evresine geçiş olur ve bunun sonucunda telomer boyu telomeraz aktivitesinin azlığından giderek kısalır. Telomerler bu nedenle kromozomal sürekliliği sağlama yeteneklerini yitirirler ve telomer krizi denilen aşamaya geçiş yaparlar (Henderson, 1988). Bu evre p53'ten bağımsızdır ve kromozomlarda kararsızlık ve neticede hücrenin mortalitesine sebep olur. Hücre telomer uzunluğu M2 noktasında stabil olarak kalabilirse hücre bu noktayı aşarak bölünmeye devam eder ve ölümsüzleşir. Bu olaylar telomerazın tekrardan aktif hale gelmesi veya telomeraz enziminin regülasyonu ile meydana gelir. M2 aşamasını kanser hücreleri aşar (Henderson, 1988; Hayflick, 1961). Sperm hücrelerinde gözlenen uzun telomerler ve bu telomer dizi uzunluklarının istikrarlı olarak muhafaza edilmesiyle bu durum doğrulanmıştır (Morin, 1997).

Telomerik yaşlanma, programlı bir süreç olup telomerik DNA'da görülen kısalmayla bağlantılıdır (Henderson, 1988). İnsanlardaki embriyo hücreleri hemen hemen 60-80 kez replike olduktan sonra yaşlanma emareleri göstermeye başlar. Orta yaşlı insanlarda alınan hücreler gözlemlendiğinde ise yaşlanmadan önce 10-20 kez replike oldukları gözlenir. Yaşam süreleri fazla olan türlerdeki replikasyon sayısı yaşam süresi kısa olan türlere kıyasla daha fazladır (Moyzis ve ark., 1998). Telomerik olmayan yaşlanma, mitojenik veya onkojenik uyarımlarla bağlantılıdır (Henderson, 1988). Normal somatik hücreler ve dokular yalnızca senesens durumuna kadar gelebilirler sadece dönüşüm yapabilen hücreler veya eşey hücreleri sonsuz bölünme özelliğine sahiptir (Hayflick ve Moorhead, 1961).

Telomer boylarına oksidatif stres negatif olarak etki eder. Fibroblastlar üzerinde yapılan çalışmalarda telomer boylarına oksidatif stresin büyük çaplı etki ettiği bildirilmiştir (Von Zglinicki ve ark., 1995; Von Zglinicki ve ark., 2000). Fibroblastlar üzerine yapılan bir çalışmada oksidatif stres faktörünün telomerlerde telomeraz enzim aktivitesini inhibe ettiğini ve telomerik olmayan kromozomal DNA'ya kıyasla fazla hasar meydana getirdiği bildirilmiştir (Von Zglinicki, 2000). Akut olarak gerçekleşen oksidatif stresin ilk olarak etkiledikleri arasında telomerler gelmekte ve bu sebeple meydana gelen tek zincir kırıkları için herhangi bir tamir mekanizmasının olmadığı bildirilmiş olup daha az düzeydeki kronik oksidatif stres ise telomer boylarının ksalmasını hızlandırır. Ayrıca oksidatif stres, oksidatif strese hassas ve kolay kırılabilen “GGG” kısımlarında kopmalara sebep olduğu ve telomerlerde mevcut olan nükleaza duyarlı kısımları arttırdığı bildirilmiştir (Von Zglinicki ve ark., 1995; Von Zglinicki ve ark., 2000; Kawanishi ve ark., 1999). Ektopik telomeraz enzim ekspresyonunun primer fibroblast kültürlerde telomer uzunluklarının azalmasıyla ilişkili hücre yaşlanmasını engellediği ve söz konusunu hücrelerin yaşam ömürlerini uzattığı gözlemlenmiş ve hTERT'in neoplastik transformasyona neden olmadığı bildirilmiştir (Counter ve ark., 1998). Yapılan çalışmalarda edinilen bilgiler ışığında telomeraz enziminin, telomerlerin ve telomer proteinlerinin kanser ve yaşlılık gibi durumların belirleyicileri olarak kabul edilmiştir (Bryan ve Reddel, 1997).

Telomerler uzunluklarının yaşlanmayla bağlantısını birtakım örnekler desteklemiştir. Kısa yaşamlı türlerde hücre bölünmesi uzun yaşamlı türlere göre daha az olması, yaşlı hücrelerin genç hücrelere göre daha az bölünme göstermesi ve normal insanlardakine kıyasla erken yaşlanma sendromlu (Werner sendromu) hücre bölünme sayısının daha az gözlenmesi gibi bulgular örnek verilebilir (Hayflick ve Moorhead, 1961). Somatik hücrelerin yaşlanma özellikleri spesifik bir kazanç sağlar. Belirli sınırlar içerisinde hücrenin bu döngüsü kanser olma ihtimalini azaltmaktadır (Morin, 1997). Transformasyon neticesinde hücre yaşlanmasının engellenmesi insan papillomavirüs (HPV), adenovirüs ve Simian virüs 40 (SV 40) benzeri DNA tümör virüsleri aracılığı ile sağlanabilir (Bryan ve Reddel, 1997). Hidrojen peroksit, onkogen transfeksiyon, iyonize radyasyon ve natural hidroperoksitlerle karşılaşma neticesinde pRB-p16 ve/veya p53 yolaklarını uyararak replikatif yaşlanmanın başlatabildiği

bildirilmiştir (Von Zglinicki ve ark.; Chen ve Ames, 1994; Palmero ve ark., 1998). ‘p110RB’ ve ‘p53’ gibi proteinler tümör virüslerinde bulunur, tümör inhibe edici proteinlere bağlanır ve inaktive edici özelliklere sahiptirler genel olarak, transforme olan hücre kültürleri uzun bir yaşam döngüsü gösterirler. Edinilen bu bilgi uzun hayat döngüsüne sahip viral transforme hücrelerin bu moleküllerin inaktivasyonu ile oluştuğunu göstermek için bir delil oluşturmaktadır. Birçok immortal hücre gen delesyonları ve mutasyonlar nedeni ile p110RB ve p53 içermezler (Bryan ve Reddel, 1997).

Replikatif yaşlanmanın en önemli faktörlerinden biri de telomer kısalmasıdır. Prokaryotik hücrelerde ise kromozomlar sirküler bir yapı gösterirler ve kromozom ucu mevcut olmadığından telomer kısalması olmamaktadır (Flanary ve Streit, 2003). Programlı yaşlanma selektif bir avantajı da beraberinde getirir. Düzenli büyüme ve hücre ölüm belli kurallar çerçevesinde gerçekleşir. Programlı yaşlanma neticesinde kanser olma riski azalır (Klapper ve ark., 2001).

Kiyono ve arkadaşları yaptıkları çalışmada telomeraz enziminin primer hücrelerde proliferasyonu arttırmada tek başına sorumlu olmadığını göstermiştir (Kiyono ve ark., 1998). Yapılan bir çalışmada fazla TERT ekspresyonunun farelerin embriyonik hücrelerinde telomerlerle bağlantılı olmadan antioksidan korunma düzeyini optimize ettiğini ve hücrenin strese karşı dirençli hale gelmesini sağladığı düşünülmektedir (Armstrong ve ark., 2005). Antioksidanlar üzerinde yapılan çalışmalar gösteriyor ki replikatif yaşam sürecinin uzatılmasında bir etkisinin olmadığını ve yalnızca hazırda var olan telomer uzunluğunun korunmasına katkı sağladığı gözlenmiştir (Von Zglinicki ve Saretzkı, 2002). Yapılan çalışmalardaki farklı keşiflerden biri de mitokondri organeline ekstrasükleer bir telomeraz enziminin keşfedilmesi ve hücrenin oksidatif strese karşı direnci ve hücrenin sağkalımı ile bağlantılı olduğudur (Chen ve ark., 2008; Massard ve ark., 2006). ‘hTERT’ oksidatif strese karşı fibroblastları zamana ve doza bağlı olacak şekilde koruduğu nükleus dışına geri dönüşümlü olarak atıldığı gözlenmiştir (Büchner ve ark., 2010).

Haendeler ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada mitokondriyal hTERT’in uygun düzeyli strese maruz kalırken peroksit ve superoksit seviyesinin azaltılmasında,

mtDNA'nın korunulmasında ayrıca membran potansiyelinin artmasında rol aldığı ve hTERT'in normalden fazla eksprese olduğu hücrelerde çekirdek dışına çıkarak mitokondride lokalize olduğu gözlenmiştir (Haendeler ve ark., 2003).

2.7. Telomeraz Enzimi Ölçüm Yöntemleri

Telomeraz enzim aktivitesinin belirlenmesi için pek çok yöntem geliştirilmiştir.

2.7.1. TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) Yöntemi

Bu yöntem PCR ile telomerik tekrarların çoğaltılmasına dayanır (McKevitt, 2002). TRAP yöntemi, Kim ve ark. Tarafından 1994 yılında ilk kez tanımlanmıştır. Bu yöntemde doku ve hücrelerden alınan homojenat telomeraz enzimi barındırıyorsa, ortama ilave edilen spesifik olarak hazırlanmış primer telomeraz enzimi ile uzatılır. Bu işlem sonucunda elde edilen extension product (uzama ürünleri), PCR amplikasyonunda kalıp; internal standard olarak (Sıçan 150 bp'lik myogenin fragmentleri) kullanılır ve ürünler spektroforetik olarak ayrılır. Radyoaktif işaretli dCTP'ler PCR ortamında eklenerek veya radyoaktif işaretli primerler kullanılarak telomeraz enzim ürünlerinin gözlenmesi sağlanır. TRAP yöntemi sonunda Image Analyzer (Görüntü çözümleyici) kullanılır. Elde edilen bilgiler döngü sayısına bağlı olarak grafiklenir ve belli bir standarda göre değerlendirilir. Ancak miktar saptamasın sensitivitesi düşüktür. Sonuçlar, pozitif ya da negatif olarak değerlendirilir bunun nedeni aktiviteyi nicel bir şekilde saptamanın zor ve güvensiz olmasıdır. Jel SYBR green I boyası radyoizotoplarının istenmediği durumlarda kullanılabilir. Bu yöntemin kusurları;

1. Radyoizotoplara ihtiyaç duyulması
2. Zaman alıcı poliakrilamid jel elektroforeze gereksinim olması,
3. Klinik örneklerden gelen PCR inhibitörlerinin etkilerine açık oluşu
4. Miktar saptamada karşılaşılan zorluklar

5. İnternal kontrole gereksinim olması

6.CX (5'-CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA-3') primerde primer-dimer oluşumu olarak sıralanabilir (Kim ve ark., 1994).

2.7.2. Floresan-TRAP (F-TRAP) Yöntemi

Aldous ve Grabill, 1997 yılında yaptıkları bir çalışmada telomeraz enzim aktivitesini gözlemek için Floresan-TRAP (F-TRAP) yöntemini kullanmışlar bu yöntemde floresans işaretli primerler, radyoizotoplarını elimine etmek için kullanılmaktadır (Aldous ve Grabill, 1997). Ancak TRAP yöntemi hassas miktar saptamaya pek uygun değildir. Elde edilen sonuçlar pozitif ya da negatif şeklindedir. TRAP yönteminin eksiklerinin giderilmesi için TRAP-eze-Elisa ve TRAP-eze kitleri alternatif olarak geliştirilmiştir (McKevitt, 2002).

Bunlar;

- 1) TRAP-eze
- 2) TRAP-eze-Elisa kitleridir.

2.7.3. TRAP-eze Yöntemi

Oncor firması tarafından 1996 yılında kit halinde üretilmiştir. Bu kitler fiyat, sensitivite ve zaman açısından karlılık sağlamıştır. Bu kitte 'reverse' primer (RP) TRAP'daki 'reverse' primer CX'in modifiye edilmiş şeklidir. Kitte 36 bp'lik internal standard mevcut olup primer-dimer'in meydana gelmesi azaltılmıştır (Holt ve ark., 1996).

2.7.4. TRAP-eze-Elisa Yöntemi

Bu yöntemde ilk olarak telomeraz, forward (Biyotin işaretli) P1-TS (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3') primerinin 3' ucuna telomerik tekrar dizilerini ekler. Daha sonra uzayan ürünler P2 (reverse) primeri kullanılarak PCR ile çoğaltılır. PCR ürünleri denatüre bir yapı kazandırılır ve telomerik tekrar dizileriyle beraber melezlenebilen digoksinin işaretli özel prob ile melezlenir. Son ürünler biotin

işaretili primer aracılığı ile streptoavidin kaplı mikrotiter plaklarına bağlanır. AntiDIG-peroksidaz ile plaklara bağlı PCR ürünleri kompleks meydana getirir. Son aşamada peroksidaz substratı 3,3',5,5'tetrametil benzidin (TMB) peroksidazca renkli oksidasyon ürünlerine çevrilir ve renk oluşumu tepkime durdurucu çözelti ilave edilerek durdurulur. Numunelerin absorbanları 620 nm ve 450 nm'de mikrotiter plak okuyucuda okunur (Holt ve ark., 1996).

2.7.5. TMA-HPA (Transcription Mediated Amplification and Hybridization Protection Assay) Yöntemi

Hirose ve arkadaşları tarafından önerilmiştir. Bu yöntem örneklerden gelebilecek TRAP baskılayıcılarından çok az etkilenir. Ayrıca uygulaması hızlı ve kolaydır. Bir saat gibi bir sürede tek bir kalıptan milyarları bulabilen RNA ampliconu meydana getirebildiğinden ve telomeraz enzim ürünlerinin transkripsiyon yoluyla amplikasyonu çabuk gerçekleştiğinden su banyosu bu yöntemde kullanılabilir.

Bu sistem esasında telomeraz enzimi tarafından uzatılacak primere promotor eklenmesi ve RNA'larla hibridize olmuş ve olmamış problemlerin ayrı bir şekilde hidroliz olmalarına dayanır. Bu yöntem örnek numunelerinden gelebilecek TRAP inhibitörleri en az miktarda etkilenmektedirler ayrıca kolay ve hızlıdır. Telomerik tekrar ile promotor primerin birleşme noktasına komplementer olan akridinyum ester-işaretili problemler hazırlanarak kullanılır. Problemler ve ampliconların 20 dk 65 °C'de inkübasyonu gerçekleştirilir ve tekrardan 10 dk boyunca hidroliz tamponu eklenerek inkübasyona devam edilir. Akabinde soğutulur. Kemiluminesans, luminometre ile ölçülür (Hirose ve ark., 1998).

2.7.6. PicoGreen Yöntemi

Gelmini ve arkadaşları, 1998 yılında PicoGreen yöntemini oluşturmuşlardır. Bu yöntem miktara bağlı, hızlı ve nonizotopik bir prosedürdür. Bu sistemde telomeraz enzim ürünlerinin çoğaltılmasında 'Stretch-PCR' prosedürü uygulanır. PicoGreen, floresan bir boya olup spesifik olarak çift zincirli DNA'ya bağlanır. Floresans ölçümleri spektrofotometre yardımıyla okunur ve kontrol DNA'sı olarak oluşturulan

standart eğride hesaplanır miktara bağlı, hızlı, nonizotopik olan bir assay yöntemi olarak kabul edilir. PAGE benzeri vakit alıcı işlemler PCR ürünlerine uygulanmaz. Ona alternatif olarak PicoGreen ile PCR ürünleri muamele edilir. Saptanan DNA miktarından negatif kontrolde ölçülen DNA'nın çıkarılması ile telomeraz enziminin aktivitesini belirleyen DNA miktarı hesaplanır. Negatif kontrol olarak RNAaz ile muamele görmüş doku veya hücre homojenatı kullanılır. Protein düzeyi hesaplanmış her örnek için sonuçlar ng DNA/ μ g olarak verilir (Gelmini ve ark., 1998).

2.7.7. In Situ-PCR Yöntemi

Ohyashiki ve arkadaşları, 1997 yılında In situ PCR yöntemiyle telomeraz varlığını tümör hücrelerinde göstermişlerdir. Bu yöntem TRAP yönteminin modifiye edilmesiyle oluşturulmuş olup hücre seviyesinde telomeraz enzim aktivitesinin incelenmesi sağlanmıştır (Ohyashiki ve ark., 1997).

2.7.8. RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) Yöntemi

Yajima ve arkadaşları, 1998 yılında Reverse Transkripsiyon-PCR (Reverse Transcription PCR Assay or Taq Man Fluorogenic Detection System). Yöntemini oluşturmuşlar. TP1, TERC, TERT komponentleri klonlandıktan sonra, komponentlerin mRNA seviyelerinin ölçülmesi enzim aktivitesi üzerine yapılan çalışmalarda yeni bir yaklaşım oluşturmuştur. Bu protokolda özel PCR ürününün değerlendirilmesinde DNA polimeraz enziminin 5'→3' ekzonükleaz etkinliğinden yararlanılır. PCR'ı 'Taq Man' analizi nicel hale getirir. Bu sistemde bir hibridizasyon probu ile 'reverse' ve 'forward' primeri hTR için yer alır. PCR'ın uzama aşamasında Taq polimeraz enzimi, uzama yeteneği içermeyen ve iki ucundan işaretli florojenik hibridizasyon problemlerini keser ve bu koşma primeri yerleştirir. Bunlar olurken serbest floresans veren habercilerin çıkarılma işlemi tamamlanmış olur. Zaman kaybetmeden hemen bunlarda okunur. Bu işlem için floresans dedektör ve birleştirilmiş PCR kullanılır. Sürekli olarak optik ekrandan floresansdaki artış izlenir. PCR sonrası hiçbir işlem yapılmaz prob 3' ucundan floresans söndürücü bir boyayla işaretlenirken 5' ucundan JOE veya FAM olarak adlandırılan haberci floresan boyalar ile işaretlenir. 3' ucundaki boya 5' ucundaki etkiyi yok edeceğinden prob bütün iken hiçbir sinyal

vermez. Amply Taq DNA tarafından prob, 5'→3' doğrultusunda kesilerek yerine 'forward' primer girer ve primer uzatılır. JOE 554 nm'de, FAM ise 517 nm'de okunur. Sonuçların değerlendirilmesinde standart eğri kullanılır. Amplifikasyon üç aşamada gerçekleşir.

1. Evrede; 'Reverse' transkriptaz aktivitesi, 48 °C 30 dk.
2. Evre; RT inaktivasyonu ve Amply Taq Gold aktivasyonu, 95°C 10 dk.
3. Evre; 40 PCR döngüsü, 60°C 1 dk (Yajima ve ark., 1998).

Yapılan çalışmalar neticesinde, RT-PCR yöntemiyle değerlendirme yapılacaksa TERT'in gösterge düzeyinin ölçülmesinin seçilebileceği, TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) yöntemi kullanılacaksa stretch-PCR ve PicoGreen yönteminin uygulanması düşünülebilir (Zavlaris ve ark., 2009).

2.7.9. Strech-PCR (Stretch-PCR assay) Yöntemi

Tatematsu ve ark. 1996 yılında TRAP yöntemi üzerinde çalışarak onu biraz daha geliştirip spesifik olarak planlanmış primerler kullanarak bu yöntemi tasarlamışlardır. PCR kullanılarak yapılan yöntemlerde bazı sorunlar gözlenebilir.

1) Reverse ve Forward primerleri tekrar eden diziler için hazırlanmıştır ve kendi aralarında efektif bir şekilde hibridize olarak farklı birliktelikler meydana getirebilirler. Uzama ürünleri yerine amplifikasyon sırasında bunlar çoğaltılabilir. Burada telomeraz enziminin uzatılmış primer kalıp gibi kullanılabilir.

2) Telomeraz enzimi ile uzatılmış yinelenen diziler ile reverse primerler hibrid yapabilirler. Neticede kısalmış PCR ürünleri meydana gelebilir. Bu problemlerin aşılabilmesi için bu yöntemde spesifik olarak tasarlanmış primerler kullanılmıştır. Bazı avantajlar elde edilmiştir.

1. Reverse ve Forward primerleri eşleşmeyen bir baz çiftini (mismatch) 3' uçlarında barındırırlar. Bu sebeple primer-dimer oluşsa da uzamayı önler. Telomeraz yalnızca dimer meydana getirmeyen forward primeri uzatır.

2. Telomer dizileriyle bağlantılı olmayan (M13-U, M13-R) ekstra ‘tag’ dizileri bu primerlerin 5’ uçlarına eklenir. Bunun neticesinde PCR ürünleri amplifikasyonda daima orjinal uzunluklarını muhafaza eder (Tatematsu ve ark., 1996).

2.8. Telomer Uzunluğu ve Telomer Kaybı

Telomer boyları hücrelerin yaşam süreleri üzerinde etkilidir (Jesus ve Blasco, 2013). Yavru hücrelere, eşey hücreleri boyları tam kromozomları transfer etmek zorundadır ancak telomer hipotezi, normal somatik hücrelerdeki yaşlanmayla beraber telomer uzunluğunun kısaldığını ileri sürmektedir. Kan hücrelerindeki telomer boylarının yaşı ilerlemesiyle azaldığı gözlenmiştir buna karşın sperm hücreleri telomer boylarını kararlı bir şekilde korumaktadır ve uzun telomer dizileri içerirler. Bu gözlemler somatik dokuların telomer bütünlüğünü sağlayamadığını fakat eşey hücrelerinin telomer bütünlüğünü sağladığını göstermektedir (Long ve ark., 2005).

Kromozomlar üzerinde yapılan ilk çalışmalarda inversiyon ve delesyonların terminal bölgede az sayıda olduğu bildirilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda telomerlerin kromozomların bütünlüğünün sağladığı gözlenmiştir (Blasco, 2005). Telomer boyunu etkileyen pek çok fizyolojik ve genetik faktör bulunmaktadır. Telomer uzunluğunu stabilizasyonunu sağlayan bir sistem olmasaydı semikonseratif DNA replikasyonu neticesinde kromozomlar zamanla uç kısımlarından kısırlardı. Hücre kültüründe ölü hücrelere ait telomer boylarının birinci jenerasyon başına 65 bp (baz çifti) kadar kısaldığı gözlenmiştir. İnsanlarda bulunan üreme dizisi hücrelerinin kromozomal uçlarında telomerik AGGGTT tekrarı mevcut olup 10 kp’lıktır. Telomer boyunun artan hücre yaşı ya da bölünme hızı ile azaldığı bildirilmiştir (Olovnikov, 1973). Farklı dokular üzerinde yapılan çalışmalarda gözlemlenen telomer uzunluğunun kısılmasının, hücrelerin yaşlanmasına, somatik hücrelerde çoğalmanın sınırlandırılmasına ve ileri aşamalarda ölüme bile sebebiyet verebileceği bildirilmiş olup laboratuvar araştırmalarında hücrelerde birkaç bölünmenin ardından fazla miktarda telomer nükleotiti kaybetmesine bağlı olarak öldüğü bildirilmiştir (Ramunas ve ark., 2015).

Hücre siklusunda oluşabilecek telomerik zincirlerin yitirilmesi kromozomal anomalilere neden olabilir. Örnek olarak, mayalarda görülen 'est1' mutasyonu ile oluşan telomer boyunun kısılması, ölüme ve kromozom kaybına sebep olabilmektedir (Muntoni ve Reddel, 2005). Telomeraz enzimi, hücrede ne kadar aktif rol oynarsa hücredeki telomer de bir o kadar uzun olur. Uzun telomer de hücrenin bölünme kapasitesini artırır (Griffith ve ark., 1999). DNA hasarına benzer şekilde, yeterli kısalığa ulaşmış telomerlerde bir sinyal üretirler bu sinyal ile yaşlanma ya da hücrel ölüm başlatılır. Yapılan araştırmalar hücrel ölümün telomer boyuyla alakalı olduğu ortaya konmuştur (Jiang ve ark., 2013).

Hosting ve arkadaşları, 2004 yılında yaptıkları çalışmalarında yeni doğmuş rat beyin, böbrek, karaciğer ve akciğer dokularında TRF uzunluklarını hemen hemen birbirine yakın 60-65 kb civarında bulmuşlardır. Fakat yetişkin fare dokuları arasında fark tespit edilmiştir. Örnek olarak, yetişkin bir farede beyin ve böbrek telomerleri testis telomerlerine göre 2-3 kb daha kısa ayrıca karaciğer telomeri testis telomerine göre 1 kb daha uzundur (Prowse ve Greider, 1995).

Brümmendorf ve arkadaşları, 2002 yılında yaşları 2-10 yaşlarındaki kedilerde bir çalışma gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada lenfositlerde ve granülositlerdeki telomer boyları ölçülmüştür. İnsana kıyasla kedilerdeki telomer boylarının 5-10 kat daha uzun olduğu gözlenmiştir. Fakat insanlara kıyasla kedilerde telomer boylarının kısılma oranının daha hızlı olduğu neticesine ulaşılmıştır. Ayrıca yaşlı kedilere kıyasla gençlerde telomer boylarının granülositlere oranla lenfositlerde daha fazla olduğu gözlenmiştir. İlerleyen yaşla birlikte lenfosit ve granülositlerdeki telomer boylarının kısaldığı ve her iki kan hücresinde yenidoğanlardaki telomer kısılmasının hızlı gerçekleştiği bildirilmiştir (Brümmendorf ve ark., 2002).

McKevitt ve arkadaşları, 2002 yılında Miniature Schnouzer, Labrador ve Beagle ırkı köpeklerde yaptıkları bir çalışmada yaşın ilerlemesiyle TRF uzunluğunun kısaldığını gözlemişlerdir. TRF uzunluklarının periferik kan mononükleer hücrelerinde 9,7-22,3 kb arasında değişken olduğunu bildirmiş ve farklı ırklar arasında TRF uzunluklarının değişik olduğunu gözlemişlerdir (McKevitt ve ark., 2002).

Fick ve arkadaşları, 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada 15 farklı ırktan 175 köpek kullanarak bir çalışma gerçekleştirmişler. Bu çalışmada PBMC hücrelerinde telomer boyları ölçülmüştür. İnsanlarda telomerik DNA kaybının yılda 20-40 bp arasında azalmasına karşın köpeklerde 360 bp olduğunu ve köpeklerde insanlara kıyasla 10 kat daha hızlı gerçekleştiğini bildirmişlerdir (Fick ve ark., 2012).

Cawthon ve arkadaşları, 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada telomer boyları ile bireyin ölümü arasındaki ilişkiyi 60 yaş üstü toplam 143 bireyde incelemiştir. Erkek telomer boylarının, kadın telomer boylarına göre daha kısa olduğunu bildirmiştir. Kısa telomer boyuna sahip olan bireylerin daha kısa sahip olma potansiyellerinin olduğu ve 8,54 kat enfeksiyöz hastalıklarda, 3,18 kat kalp hastalıklarında ölüm olasılığının fazla olduğu gözlenmiştir. Yaşı ilerlemiş bireylerde telomer boyunun; hücre bölünme hızı, çevresel faktörler, telomeraz enzim aktivitesi, oksidatif stres ve genetik faktörlerden kaynaklanan etkilenebileceği neticesine varılmıştır (Cawthon ve ark., 2003).

Shervington ve arkadaşları, 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada normal hücreler ve glioma kanser hücreleri üzerinde çalışmışlar yaşları 20 ile 39 arasında olan bireylerde telomeraz mRNA ekspresyonunu %100 olarak, 40 ile 70 yaş aralığındaki bireylerde %25 eksprese olduğu gözlenmiştir. Telomer boyları incelendiğinde sağlıklı bireylerde 7,4-9,5 kbp, yaşlı kanserli bireylerde 6,1-10,1 kbp ve genç kanserli bireylerde 11,5 ile 16,3 kbp arasında olduğu bildirilmiştir (Shervington ve ark., 2008).

Fransada 2013 yılında yapılan bir çalışmada ortalama yaşları 56 olan toplam 73 kadın, 120 erkekte telomer boyları beyaz kan hücrelerinde ölçülmüş erkeklerde 8,37 kbp olarak hesaplanan bu uzunluk kadınlarda 8,67 kbp olarak gözlenmiştir. Ayrıca hem erkek hemde kadında yaş ile telomer boyu arasında korelasyon olduğu bildirilmiştir (Benetos ve ark., 2013).

Yamada ve arkadaşları, 2013 yılında 50 ile 60 yaşlar arasındaki donörlerden elde edilen normal kan hücrelerinde telomer boylarını 8,5 ile 9 arasında gözlemlerken, tedavi öncesi 12 lösemili hastadaki lösemik hücrelerde telomer boyları 4,7 kb olarak tedavinin ardından ise 8,2 kb olarak gözlemlenmiştir (Yamada ve ark., 2013).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Gerecin Tanımı

Araştırma materyalini, Burdur ilinde bulunan çiftliklerdeki büyükbaş hayvanlar oluşturdu. Bu araştırma çalışmasında kullanılacak hayvanlar değişik yaş gruplarında ve sadece Simental ırkı olması şartıyla kan örnekleri toplandı.

3.1.2. Hayvan Materyali

Yukarıda belirtilen kriterlere göre, toplam 46 hayvandan kan örneği toplandı. Bu örnekler Grup 1: 1 günlük 8 adet (4 dişi, 4 erkek) buzağı, Grup 2: 6 aylık 8 adet (4 dişi, 4 erkek) buzağı, Grup 3: 8 adet (4 dişi, 4 erkek) 1 yaşında dana (düve), Grup 4: 4 yaşında 12 adet (6 dişi, 6 erkek) sığır, Grup 5: 6 yaşında 10 adet (5 dişi, 5 erkek) Simental ırkı sığırlar kullanıldı. 1 günlük olanlar canlı ağırlığının %10'u kadar kolostrum almıştır. Kan alma işlemi sırasında herhangi bir hastalık semptomu gözlenmemiş olup yeme-içme ve fizyolojik fonksiyonlarında herhangi bir sorun saptanmamıştır. Tarım ve Orman Bakanlığı'nın rutin olarak yaptığı aşılama programı dahilinde aşılama yapılmıştır. (Brucella, şap, LSD)

Bu çalışma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 13 Mart 2019 tarihli ve 503 sayılı kurul kararı kapsamında yapılmıştır.

3.2. Yöntem

Bütün sığırlardan venöz kan örnekleri vena jugularisten 21 gauge iğneli Vacutainer® holder yardımıyla negatif basınçlı tüplere alındı. Serum örnekleri için pıhtı aktivatörlü silikon tabanlı plastik tüpler (9 ml) kullanıldı. Toplanan kan örneklerinin pıhtılaşması sağlanarak, santrifüj cihazında 4000 rpm/5 dk' da serumları çıkarıldı. Çıkan serum örnekleri mikropipet kullanılarak eşit olarak Eppendorf

tüplerine (1.5 ml) aktarıldı. Üzerilerine numune numaraları yazılarak kayıt altına alınan tüpler -20 °C’de işlenene kadar saklandı.

3.2.1. ELISA Yöntemi ile Telomeraz ve Immunglobulin Verilerinin Toplanması

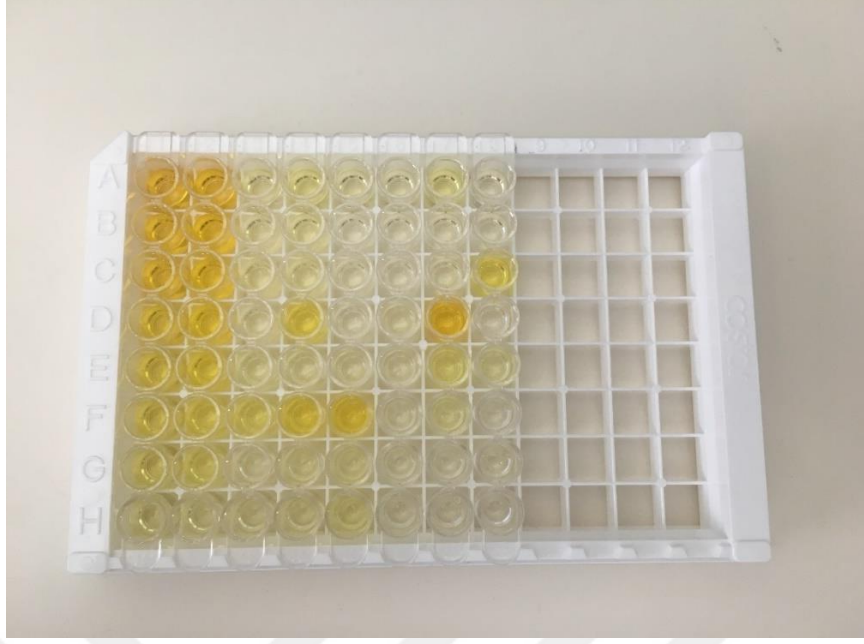
Sığır cinsi ve simental ırkı farklı yaş gruplarından toplamda 46 kan serumu, telomeraz enzimi ve IgG yönünden ELISA testi ile tarandı İmmunglobulin için ‘Bio-X Diagnostics S.A ELISA, Belçika testi kullanılırken Telomeraz enzimi için ‘Mybiosource For the quantitative detection of Bovine Telomerase (TE) concentration in serum, plasma and other biological fluids. Catalog Number: MBS281594) kullanılmıştır.

ELISA kitlerinde verilen tüm prosedürlere uyularak kit ELISA (BioTek-Epoch) okuyucusunda okunacak duruma getirildi.



Şekil 3.1. Kan serumlarının ELISA kitine konulması

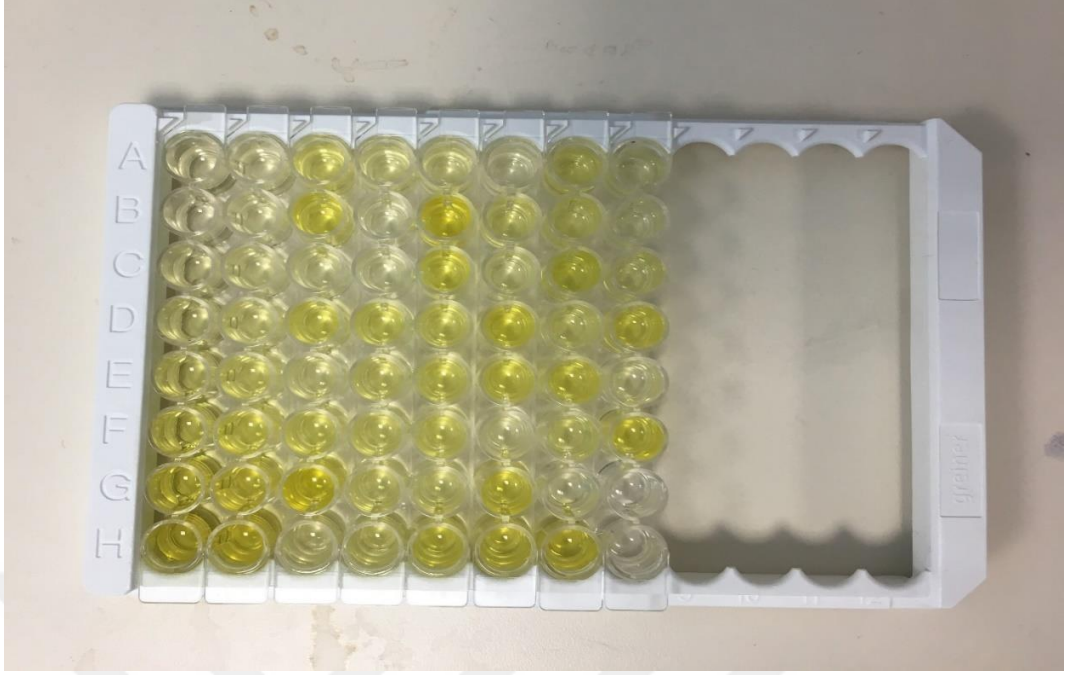
ELISA okuyucusunda telomeraz enziminin ve Immunglobulin G’nin kan serumundaki yüzdeleri sayısal olarak tespit edildi.



Şekil 3.2. ELISA yöntemi ile serumda Telomeraz düzeyinin ölçümü

Tablo 3.1. ELISA yöntemiyle kan serumunda telomeraz enzimi ölçümünün özeti

AŞAMA	YAPILAN İŞLEM
1	Ayırıcılar, numuneler ve standartlar tarif edildiği gibi hazırlandı.
2	Her hazneye 100 µL Standart veya Numune eklendi. 37°C`de 2 saat inkübe edildi. Aspire edildi ve 3 kez yıkandı.
3	Her göze 100 µL Biotin-Konjuge (1x) eklendi. 37 °C`de 1 saat inkübe edildi. Aspire edildi ve 3 kez yıkandı.
4	Her göze 100 µL Streptavidin-HRP (1x) eklendi. 37 °C`de 1 saat inkübe edildi. Aspire edildi ve 5 kez yıkandı.
5	Her göze 100 µL Substrat Çözeltisi eklendi. 37 °C`de 15-20 dakika inkübe edildi.
6	Her göze 50 µL Durdurma Çözeltisi eklendi.
7	5 dakika içinde 450 nm`de okundu.



Şekil 3.3. ELISA yöntemi ile serumda IgG düzeyinin ölçümü

3.3. İstatiksel Analiz

Elde edilen bulgular IBM SPSS 22.0 for Windows paket programı kullanılarak değerlendirildi. Verilerin Normal dağılıma uygunluğunun belirlenmesi için Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Verilerin normal dağılmaması nedeniyle çoklu grup karşılaştırmaları Kruskal-Wallis testi ile belirlendi. Değişkenler arasındaki ilişkinin analizi için Spearman Korelasyon katsayısı kullanıldı.

4. BULGULAR

Araştırmada toplam 46 hayvandan alınan kan örneklerinden elde edilen telomeraz ve IgG düzeyleri Tablo 4.1.'de verilmiştir. Araştırmada toplam 46 hayvandan kan örnekleri toplandı. Elde edilen sonuçlara göre telomeraz enziminin değeri giderek azalmasına rağmen istatistiksel olarak 1 günlük ile 6 aylık arasındaki hayvanlarda ve 1 yaş ile 4 yaşındaki hayvanlar arasında önemli farklılık gözlenmedi. Ancak 6 yaşındaki hayvanlarda telomeraz enziminin seviyesinde önemli düşüş tespit edildi. Yine bulgularımıza göre yaşı ilerlemesi ile telomeraz enziminin seviyesinde azalma söz konusu olmuştur. IgG parametresinin seviyesine bakıldığında 1 günlük hayvanlarda en düşük seviyede olup 4 yaşa kadar giderek artış gösterirken yine 6 yaştan sonra düşüş gözlenmiştir (Tablo 4.1.). Çalışmada aynı yaş grubundaki hayvanlarda anlamlı fark saptanmamıştır. Cinsiyete göre değişiklik tespit edilmemiştir.

Tablo 4.1. Simental ırkı sığırlarda farklı yaş gruplarında serum telomeraz ve IgG düzeyleri

GRUP	GRUP 1(n=8)	GRUP 2(n=8)	GRUP 3(n=8)	GRUP 4(n=12)	GRUP 5(n=10)	P
Parametre	$\bar{x} \pm ss$	$\bar{x} \pm ss$	$\bar{x} \pm ss$	$\bar{x} \pm ss$	$\bar{x} \pm ss$	
TEL	0,33±0,10 ^a	0,31±0,068 ^a	0,26±0,30 ^b	0,22±0,39 ^b	0,04±0,03 ^c	<0,001
IgG	20,21±17,40 ^a	33,18±11,12 ^{ab}	46,32±11,70 ^b	49,18±17,32 ^b	34,10±13,12 ^{ab}	<0,001

Farklı harf içeren sütunlar arasında istatistiksel fark vardır (p<0,05).

5. TARTIŞMA

Bilim insanlarına göre enfeksiyona karşı yaşla ilişkili savunmasızlığın giderek artması söz konusudur (Tarry-Adkins ve ark., 2019). Zamanla etkili bağışıklığın korunması, hematopoietik kök hücrelerin (HSC'ler) immünokompetan olgun hücreler havuzunu sürdürme kapasitesine bağlıdır. Yaşlılık ile bağışıklık yetkinliğinin azalması, Murin modellerinde önerildiği gibi, kendini yenileme potansiyeli ve lenfopoezde bozulma da dahil olmak üzere HSC kusurlarından kaynaklanabilir (Fali, 2018). Bağışıklıkta yaşa bağlı düşüş, kök hücre tükenmesi, telomer kısalması ve hücreden hücreye iletişimin bozulmasıyla karakterize edilir ve bu da hastanın hastalık riskinin artmasına neden olur. Son veriler, kronik inflamasyonun immün yaşlanma üzerinde güçlü bir etkisi olduğunu ve telomer uzunluğu ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (Jose ve ark., 2017).

Yaşlanma, bulaşıcı ve kötü huylu hastalıklar dahil olmak üzere birden fazla komorbiditenin artan prevalansı ile ilişkilidir. Bu bozuklukların çoğunun, yaşlılığa bağlı bağışıklık düşüşünden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bağışıklık sistemi, bağışıklığın adaptif veya doğuştan gelen kollarına yeniden gruplanan, özel işlevlere sahip çok sayıda farklı immünokompetan hücreden oluşur. Son yıllarda yaşlı insanların bağışıklık sistemini karakterize etmek için artan çabalar, çoğu bağışıklığı yeterli hücre kompartmanının niteliksel ve niceliksel bozukluklara sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır (Tinhinane, 2018). Yaşlanma, kritik hücresel süreçlerde, sinyal yollarında ve düzenleyici mekanizmalarda kademeli bir düşüş içeren ve nihai olarak doku homeostazının bozulmasına yol açan karmaşık bir süreçtir. Zamanla "yaşlanma" olarak adlandırılan hücre fonksiyonel kusurlarının birikmesi, insan yaşlanmasının itici gücüdür ve kardiyovasküler ve nörodejeneratif bozuklukların yanı sıra otoimmün hastalık ve enfeksiyon riskinde artış sağlar. Hücresel yaşlanma ile ilişkili değişiklikler, sekretomdaki proliferasyon veya değişiklikler dahil olmak üzere çok sayıda süreci etkiler. Telomer uzunluğunu korumak ve kromozomları hasara karşı korumak için, hematopoietik progenitörler ve efektör lökositler gibi yüksek proliferatif kapasiteye sahip hücre tipleri, telomer uzunluğunu korumak için indüklenebilir enzim telomerası kullanır.

Telomer uzunluğu ve telomeraz aktivitesini inceleyen araştırmalarda, immünolojik yaşlanmada inflamasyon ve telomer biyolojisi arasındaki potansiyel etkileşimlere odaklanmaktadır. Aslında, telomeraz aktivitesi artık lökosit proliferatif aktivitesinden, devam eden enflamasyondan ve reaktif oksijen türlerinin üretiminden güçlü bir şekilde etkilendiği bilinmektedir, ancak bu etkilerin moleküler temeli henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Hücre bölünmesi sırasında telomer kısalması yaşlanmaya doğru ilerlemede kritik bir süreçtir ve telomeraz immünolojik yaşlanmada önemli bir rol oynayabilir (Jose ve ark., 2017). Immunglobülinlerin antijenik, fizyokimyasal ve biyolojik özellikleri farklılık gösterir (Hammer ve ark., 1971; Duncan ve ark., 1972). Yapısal olarak çeşitleri mevcuttur. Ruminantlarda IgA, IgG, IgM (Mehra ve ark., 2006) IgE (Thatcher ve Gershwin, 1989) olmak üzere 4 çeşit immunglobülin gözlenmiştir (Bergmann-Leitner, 2008). Immunglobülinlerin %85-90'nı IgG, %7'sini IgM ve %5'ini IgA oluşturmaktadır. IgG kanda bulunan en küçük yapılı immunoglobulin grubudur (Godden, 2008).

Kanda en çok bulunan immunglobülin olan IgG kan serumunda bulunan immunglobülinlerin yaklaşık %85-90'nını oluşturur (Klaus ve ark., 1969). Immunglobulin G'ler çok hücreli hayvansal organizmaların bağışıklık sistemleri tarafından kendi yapısından olmayan organik yapılarla mücadele etmek için üretilen moleküllerdir. Glikoprotein yapısındadırlar. Tüm vücut sıvılarında tespit edilebilirler (Tizard, 2004). Bu çalışmada değişik yaş grubundaki sığırlarda IgG ve telomeraz enziminin değerleri araştırıldı. Yeni doğan bir günlük buzağların IgG değerleri ile 6 aylık, 1 yaş, 4 yaş ve 6 yaşındaki sığırların değerleri arasında önemli fark tespit edildi ve değerler giderek arttığı gözlemlendi. Ancak 1 günlükten 4 yaşa kadar IgG değerleri artmışken 6 yaşındaki hayvanlarda bir düşüş tespit edildi. Bu tespitimize göre doğumun ilk gününden itibaren 4 yaşa kadar yaş arttıkça IgG seviyesi artışı ve immun sistemin daha güçlenmesi söz konusu olmuştur. Ancak yaştan artması ve yaşlanmanın etkisi ile 4 yaştan sonra IgG'nin seviyesi ve buna bağlı olarak immun sistemin zayıflaması gözlenmiştir ve gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). Hayvancılık sektöründe 6 yaş üzerindeki sığır popülasyonunun çok az olması nedeniyle ve sığırlar belli yaştan sonra kesime sevk edildikleri için daha yukarı yaştaki hayvanlar dahil edilemedi.

Tarry-Adkins ve arkadaşlarına göre (2019), bağışıklık yetmezliği ve enfeksiyon oranının yaşla birlikte önemli ölçüde artmakta ve yaşa bağlı vücudun savunmasızlığı giderek artmaktadır. Elde ettiğimiz bulgular bahsi geçen araştırmacıların bulguları ile paralellik göstermektedir. Enfeksiyonun bağışıklık hücrelerinde telomer erozyonunu hızlandığını gösteren bulgular, laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan deneysel araştırmalarla desteklemiştir (Giraudeau ve ark., 2019).

Jose ve arkadaşları (2017) yaptığı çalışmada bağışıklıkta yaşa bağlı düşüş, kök hücre tükenmesi, telomer kısalması ve hücre-hücre iletişiminin bozulması ile karakterize olduğu ve bu da hastalık riskinin artmasına neden olduğunu ortaya koymuşlardır. Artan yaşla birlikte vücudunun savunma mekanizması ve immün sisteminin zayıflaması sonucunda enfeksiyonların artması söz konusu olup oluşan oksidatif stresin etkisi ile telomer uzunluğu negatif yönde etkilenir. Akut olarak gerçekleşen oksidatif stresin ilk olarak etkiledikleri arasında telomerler gelmekte ve bu nedenle meydana gelen tek zincir kırıkları için herhangi bir tamir mekanizmasının olmadığı bildirilmiş olup daha az orandaki kronik oksidatif stres ise telomer boylarının kısalmasını hızlandırır (Von Zglinicki ve ark., 1995; Von Zglinicki ve ark., 2000).

Flannagan ve arkadaşlarına göre (2020) lökosit telomer uzunluğu (LTL), artan yaşla birlikte kronik hastalıkların riskini öngören inflamasyon ve oksidatif stresin biyobelirteçidir (Flannagan ve ark., 2020).

Brümmendorf ve arkadaşları, 2002 yılında Yaşları 2-10 yaş arasındaki kedilerde bir çalışma gerçekleştirmişler. Bu çalışmada lenfositlerde ve granülositlerdeki telomer boyları ölçülmüştür. Çalışma verilerine göre artan yaşla birlikte telomer uzunlukları giderek kısalma göstermiştir. Ancak İnsana kıyasla kedilerdeki telomer boylarının 5-10 kat daha uzun olduğu gözlenmiştir.

Bizim çalışmamızda ise yaşın artması ile giderek telomeraz enziminin değeri düşüş gösterdi. En yüksek değer doğumun ilk gününde ve en düşük değer 6. Yaşta gözlemlendi ($p < 0,05$). Sonuçlarımıza göre 1 günlük ile 6 aylığa kadar telomeraz enziminin

azalışında önemli bir fark saptanmadı ancak 1 yaşından sonra istatistiksel olarak önemli fark saptandı.

Çalışma sonucunda; yaşın ilerlemesi, telomeraz enziminin aktivitesi aynı zamanda bağışıklık sistemin önemli bir unsuru olan IgG'nin aktivitesinin azalmasına da etki ettiği gözlemlendi. Telomeraz enzim düzeylerinin zamanla azalmasına rağmen ilk dört grupta IgG düzeyi azalmazken ilerleyen yaşla birlikte 6 yaşındaki hayvanlarda IgG ve telomeraz değerleri arasında pozitif korelasyon ilişkisi saptandı. Farklı çalışmalar da görüldüğü gibi öne sürdüğümüz tezi destekler niteliktedir.

Bu çalışma ile yaşın ilerlemesi ile telomeraz enzimi ve immünglobülin G düzeylerindeki değişiklikleri Veteriner Hekimlik alanında ilk defa araştırıldı. Bu şekilde yaşın, vücudun immun sistemi üzerine etkisi araştırılarak ileri yaşta ortaya çıkabilecek hastalıklar veya problemler için önlem almak olanağı sağlanacaktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

İmmun sistem metabolizmanın savunmasından sorumlu bir mekanizmadır. Metabolizmanın işleyişini aksatabilecek ve sistem için zararlı olabilecek durum ve patojenlerle savaşıır. Telomerler kromozomun terminal kısımlarında yer alır ve hücresel yaşlanmada işlevsel bir rol üstlenir. Telomeraz ise kısaca telomer boylarının uzatılmasından sorumludur. Hücre yaşlanmasında ve bölünmesinde kilit rol oynar.

Bu araştırmada immun sistemin en önemli unsurlarından olan IgG ve telomeraz enzim aktivitesinin yaşa göre düzeyleri incelendi. Simental ırkı sığırlarda yapılan çalışmada yaşlanmayla birlikte telomeraz enzim aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir. İlk dört grupta IgG düzeyi azalmazken 6 yaşındaki hayvanlarda IgG ve telomeraz değerleri arasında pozitif korelasyon ilişkisi saptanmıştır. Ayrıca aynı yaş gruplarında olan hayvanlarda anlamlı fark gözlenmemiştir.

KAYNAKLAR

- Aalund O, Blakeslee D, Butler JE, Duncan JR, Freeman MJ, Jennes R, Kehoe JM, Mach JP, Rapaez J, Vaerman JP ve Winter AJ (1971).** Proposed nomenclature for the immunoglobulins of the domesticated bovidae, Cattle (*Bos taurus*), Sheep (*Ovis aries*), Goats (*Capra hircus*). *Canadian Journal of Companion Medicine.*, **35**, 346-348.
- Abdou NI, Abdou NL (1972).** Bone marrow: The bursa equivalent in man *Science.*, **175**, 446-447.
- Abel Francisco SF, Quigley JD (1993).** III. Serum immunoglobulin concentrations after feeding maternal colostrum or maternal colostrum plus colostrum supplement to dairy calves. *Am J Vet Res.*, **54(7)**, 1051-1054.
- Abuelo A, Hernandez J, Benedito JL, Castillo C (2013).** Oxidative stress index (OSi) as a new tool to assess redox status in dairy cattle during the transition period”, *Animal.*, **7(8)**, 1374-8.
- Albera E, Kankofer M (2009).** Antioxidants in colostrum and milk of sows and cow: Reproduction in Domestic Animals., **44(4)**, 606-611.
- Aldous WK, Grabill NR (1997).** A fluorescent method for detection of telomerase activity. *Diagnostic Molecular Pathology*, **6(2)**, 102-110.
- Aldridge BM, Mcguirk SM, Lunn DP (1998).** Effect of colostrum ingestion on immunoglobulin-positive cells in calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **62**, 51-64.
- Andres S, Jimenez A, Sanchez J, Alonso J M, Gomeza L, Lopez F, Rey J (2007).** Evaluation of some etiological factors predisposing to diarrhoea in lambs in “La Serena” (Southwest Spain)”: *Small Ruminant Research*. **70(2-3)**, 272-275.
- Angelopoulou K, Zavlaris M, Papaioannou N, Vlemmas I (2008).** Canis familiaris telomerase reverse transcriptase undergoes alternative splicing. *Mamm Genome.*, Sep; Epub 2008 Oct 4, **19(9)**, 647-653.
- Anugu S, Petersson-Wolfe CS, Combs Jr GF, Petersson KH (2013).** Effect of vitamin E on the immune system of ewes during late pregnancy and lactation”. *Small Ruminant Research*, **111**, 83– 89.
- Armstrong L, Saretzki G, Peters H, Wappler I, Evans J, Hole N, Von Zglinicki T, Lako M (2005).** Overexpression of telomerase confers growth advantage, stress resistance, and enhanced differentiation of ESCs toward the hematopoietic lineage. *Stem Cells*, **23**: 516–529.
- Aubert G ve Lansdorp PM (2008).** Telomeres and Aging. *Physiol Rev*, **88**, 557–579.
- Awaya N, Baerlocher GM, Manley TJ, Sanders JE, Mielcarek M, Torok-Storb B, Lansdorp PM (2002).** Telomere shortening in hematopoietic stem cell

transplantation: a potential mechanism for late graft failure. *Biol Blood Marrow Transplant*, **8(11)**, 597–600.

Bayne S, Liu JP (2005). Hormones and growth factors regulate telomerase activity in ageing and cancer. *Mol Cell Endocrinol*, **240(1–2)**, 11–22.

Beer AE, Billingham RE, Head J (1974). The immunological significance of the mammary gland. *J. Invest. Dermatol*, **63**, 65–74.

Beh KJ (1973). Distribution of Brucella antibody among in immunoglobulin classes and a low molecular weight antibody fraction in serum and whey of cattle. *Res. Vet. Sci.*, **14**, 381–384.

Benetos A, Kark JD, Susser E, Kimura M, Sinnreich R, Chen W, Steenstrup T, Christensen K, Herbig U, Von Bornemann Hjelmberg J, Srinivasan SR, Berenson GS, Labat C, Aviv A (2013). Tracking and fixed ranking of leukocyte telomere length across the adult life course. *Aging Cell. Aug*, **12(4)**, 615–621.

Ben-Porath I, Weinberg RA (2004). When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J Clin Invest*, **113**, 8–13.

Bergmann-Leitner ES, Mease RM, Duncan EH, Khan F, Waitumbi J, Angov E (2008). Evaluation of immunoglobulin purification methods and their impact on quality and yield of antigen specific antibodies. *Malaria J.*, **7**, 129–138.

Bianco D, Armstrong J, Washabau R (2007). Threatment of severe immune-mediated thrombocytopenia with human IV immunoglobulin in 5 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **21 (4)**, 694–699.

Blackburn EH (2005). Telomeres and telomerase: Their mechanism of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett*, **579**, 859–862.

Blackburn EH (1991). Structure and function of telomeres. *Nature*, **350**, 569–573.

Blackburn EH (2001). Switching and signaling at the Telomere Review. *Cell*, **106**, 661–673.

Blasco MA (2005). Telomeres and Human Disease: Aging, Cancer and Beyond. *Nature Reviews: Genetics*, **6**, 611–22.

Brambell FWR (1958). The passive immunity of the young mammal. *Biological Reviews*, **33**, 488–530.

Brümmendorf TH, Mak J, Sabo KM, Baerlocher GM, Dietz K, Abkowitz JL (2002). Lansdorp PM. Longitudinal studies of telomere length in feline blood cells: implications for hematopoietic stem cell turnover in vivo. *Experimental Hematology*, **30**, 1147–1152.

Bryan TM, Reddel RR (1997). Telomere Dynamics and Telomerase Activity in In vivo Immortalised Human Cells. *Europ J Canc*, **33(5)**, 767–773.

Burger AM, Bibby MC, Double JA (1997). Telomerase activity in normal and malignant mammalian tissues: feasibility of telomerase as a target for cancer chemotherapy. *Br J Cancer.*, **75(4)**, 516–522.

Burnet FM, Ferner F (1949). The Production of Antibodies. *Melbourne and London: MacMillan and Co. Ltd.*

Burton JL, Kehrli, ME (1996). Effects of dexamethasone on bovine circulating Tlymphocyte populations. *J. Leukocyte Biol.*, **59**, 90-99.

Burton JL, Kennedy BW, Burbside EB, Wilkie BN, Burton JH (1989). Variation in Serum Concentrations of Immunoglobulins G, A, and M in Canadian Holstein-Friesian Calves. *Journal of Dairy Science*, **72**, 135-149.

Butler JE (1969). Bovine immunoglobulins: A review. *J Dairy Sci.*, **52**, 1895-1909.

Butler JE, Kiddy CH, Pierce CS, Rock CA (1972). Quantitative changes associated with calving in the levels of bovine immunoglobulins in selected body fluids. 1. *Changes in the levels of IgA, IgG, and total protein.* *Can. J. comp. Med.*, **36**, 234-242.

Büchner N, Zschauer TC, Lukosz M, Altschmied J, Haendeler J (2010). Downregulation of mitochondrial telomerase reverse transcriptase induced by H₂O₂ is Src kinase dependent. *Experimental Gerontology*, **45**, 558–562.

Campbell SG, Siegel MJ ve Knowlton BJ (1977). Sheep immunoglobulins and their transmission to the neonatal lamb. *New Zealand Veterinary Journal*, **25**, 361-365.

Cawthon RM, Smith KR, Elizabeth O'Brien, Sivatchenko A, Kerber RA (2003). Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *The Lancet*, **361**, 393- 395.

Chen J, Patschan S, Goligorsky MS (2008). Stres induced premature senescence of endothelial cells. *J Nephrol*, **21**, 337–344.

Cherif H, Tarry JL, Ozanne SE, Hales CN (2003). Ageing and telomeres: a study into organ- and gender-specific telomere shortening. *Nucleic Acids Res. Mar 1*, **31(5)**, 1576-1583.

Chiang YJ, Hemann MT, Hathcock KS, Tessarollo L, Feigenbaum L, Hahn WC, Hodes RJ (2004). Expression of telomerase RNA template, but not telomerase reverse transcriptase, is limiting for telomere length maintenance in vivo. *Mol Cell Biol*, **24**, 7024-7031.

Chone S, Milstein C (1967). Structure and biological properties of immunoglobulins. *In: Advances in immunology, Academic Press, New York*, **7/1**.

Christley RM, Morgan KL, Parkin TD, French NP (2003). Factors related to the risk of neonatal mortality, birth-weight and serum immunoglobulin concentration in lambs in the UK". *Preventive Veterinary Medicine*, **57(4)**, 209-226.

- Codd V, Nelson CP, Albrecht E, Mangino M, Deelen J, Buxton JL et al (2013).** Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease. *Nat Genet.*, **45(4)**, 422–7.
- Colgin LM, Reddel R (1999).** Telomere maintenance mechanisms and cellular immortalization. *Current Opinion in Genetics & Development*, **9**, 97-103.
- Collins K (2006).** The biogenesis and regulation of telomerase holoenzymes. *Nature reviews Mol Cell Biol.*, **7**, 484-494.
- Cong YS, Wright WE, Shay JW (2002).** Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev.*, **66**, 407-425.
- Cortese VS (2009).** Neonatal Immunology. *Vet Clin Food Anim.*, **25**, 221-227.
- Counter CM, Meyerson M, Eaton EN, Ellisen LW, Caddle SD, Haber DA, Weinberg RA (1998).** Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase. *Oncogene*, **16**, 1217–1222.
- De Lange T (2005).** Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres, *Genes Dev*, **19**, 2100–2110.
- De Lange T, Shiue L, Myers RM (1990).** Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol*, **10**, 518-527.
- Delany Mary E., Daniels Laura M (2004).** The chicken telomerase reverse transcriptase (chTERT): molecular and cytogenetic characterization with a comparative analysis. *Gene*, **339**, 61-69.
- Detilleux JC, Koehler KJ, Freeman AE, Kehrlı ME JR, Kelley DH (1994).** Immunological Parameters of Periparturient Holstein Cattle: Genetic Variation. *Journal of Dairy Science*, **77**, 2640-2650.
- Dewell RD, Hungerford LL, Keen JE, Laegreid WW, Griffin DD, Rupp GP, Grotelueschen DM (2006).** Association of neonatal serum immunoglobulin G1 concentration with health and performance in beef calves. *J Am Vet Med Assoc*, **228(6)**, 914-921.
- Dorland M, Van Kooij RF, TE Velde ER (1998).** General ageing and ovarian ageing. *Maturitas*, **12:30(2)**, 113-8.
- Downs PD, Shen Y, Pasquali A, Beldorth I, Savage M, Gallier K, Garcia T, Booth, RE, Walter RB (2012).** Characterization of telemores and telomerase expression in Xiphophorus. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **155(1)**, 89-94.
- Duncan JR, Wilie BN, Hiestand F, Winter AJ (1972).** The serum and secretory immunoglobulins of cattle: Characterization and quantitation. *J. Immun.*, **108**, 965-976.

Edo MD, Andrés V (2005). Aging, telomeres, and atherosclerosis. *Cardiovasc Res. May*, **1;66(2)**, 213-221.

Effros RB (2011). Telomere/telomerase dynamics within the human immune system: Effect of chronic infection and stress. *Exp Gerontol. Feb*, **46(2-3)**, 135-140.

Fali T, Fabre-Mersseman V, Bayard C, Papagno L, Fastenackels S, Zoorab R, Sauce D, Appay V, Yamamoto T, Koup RA, Boddaert J (2018). JCI INSIGHT Volume: 3. Issue: 13. Article Number: e95319. *Published: JUL. 12.*

Fecteau G, Smith BP, George LW (2009). Septicemia and meningitis in the newborn calf. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, **25(1)**, 195-208.

Fick LJ, Fick GH, Li Z, Cao E, Bao B, Heffelfinger D, Parker HG, Ostrander EA, Riabowol K (2012). Telomere length correlates with life span of dog breeds. *Cell Rep. Dec*, **27;2(6)**, 1530-6.

Flanary BE, Streit WJ (2003). Telomeres Shorten with Age in Rat Cerebellum and Cortex in vivo. *J Anti Aging Med.*, **6(4)**, 299-308.

Flannagan KS, Bowman AA, Mora-Plazas M, Marin C, Rentschler KM, Rozek LS, Villamor E (2020). European Journal of Nutrition. Volume: **59**. Issue: 3. Pages: 1055-1065. DOI: 10.1007/s00394-019-01966. *Published: APR.*

Frenck RW, Blackburn EH, Shannon KM (1998). The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age. *Proc Natl Acad Sci. (USA)*, **95**, 5607-5610.

Friedrich U, Griese E, Schwab M, Fritz, P, Thon K, Klotz, U (2000). Telomere length in different tissues of elderly patients. *Mech Ageing Develop.*, **119**, 89-99.

Gapper LW, Copestake DE, Otter DE, Indyk HE (2007). Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrum and dietary supplements: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **389**, 93-109.

Gelmini S, Caldini A, Becherini L, Capaccioli S, Pazzagli M, Orlando C (1998). Rapid, quantitative non-isotopic assay for telomerase activity in human tumors. *Clinical Chemistry*, **44 (10)**, 2133-2138.

Gershwin LJ (1990). The physiochemical and biological basis of immunity. In: E.L. Biberstein and Y. Chung Zee (Ed.), *Review of Veterinary Microbiology*. Boston, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne: Blackwell Scientific Publications, 9-39.

Giguère S, Polkes AC (2005). Immunologic disorders in neonatal foals. *Vet Clin Equine*, **21**, 241-27.

Giraudeau M, Heidinger B, Bonneaud C ve Sepp T (2019). Biology Letters. Volume: **15**. Issue: 5. Article Number: 20190190 *Published: MAY 1.*

Godden S (2008). Colostrum Management for Dairy Calves. *Vet Clin Food Anim.*, **24**, 19-39.

Godson DL, Acres SD, Haines DM (2003). Failure of passive transfer and effective colostrum management in calves. *Large Anim Vet Rounds*, **3(10)**, 1-6.

Gomez DE, Armando RG, Farina HG, Menna PL, Cerrudo CS, Ghiringhelli PD, Alonso DF (2012). Telomere structure and telomerase in health and disease. *Int J Oncol.*, **41(5)**, 1561–9.

Gorham H, Yoshida K, Sugino T, Marsh G, Manek S, Charnock M, Tarin D, Goodison S (1997). Telomerase activity in human gynaecological malignancies. *J Clin. Pathol.*, **50**, 501-4.

Greider CW, Blackburn EH (1996). Telomeres telomerase and cancer. *Sci American*, **80-97**.

Greider CW (1998). Telomerase activity, cell proliferation, and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **95(1)**, 90–2.

Greider WE, Blackburn E (2009). Telomerase and Cancer. *Scientifica America*, **1**, 98-101.

Greider CW, Blackburn EH (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*, **43**, 405–413.

Griffith DJ, Corneau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Mossus H, De Lange T (1999). Mammalian telomeres an in a large duplex loop. *Cell*, **97**, 503-514.

Haendeler J, Hoffmann J, Brandes RP, Zeiher AM, Dimmeler S (2003). Hydrogen peroxide triggers nuclear export of telomerase reverse transcriptase via Src kinase family-dependent phosphorylation of tyrosine 707. *Mol Cell Biol*, **23**, 4598–4610.

Hagiwara K, Kataoka S, Yamanaka H, Kirisawa R, Iwai H (2000). Detection of cytokines in bovine colostrums, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **76(3-4)**, 183– 190.

Hall JA, Bobe G, Vorachek VR, Estill CT, Mosher VD, Pirelli GJ ve Gamroth M (2014). Effect Of Supranutritional Maternal And Colostral Selenium Supplementationon Passive Absorption Of Immunoglobulin G In Selenium-Replete Dairy Calves''. *Journal of Dairy Science*, **97(7)**, 4379-4391.

Hammer C, Tyler H, Roth JA, Quigley III JD (2004). Characterization of reactions to intravenous immunoglobulin in neonatal calves. *Animal Industry Report*, **650 (1)**, 66.

Hammer DK, Kickhöfen B, Henning G (1968). Molecular Classes and Properties of Antibodies in Cattle Serum and Colostrum Synthesized during the Primary and Secondary Response to Protein Antigens. *European Journal of Biochemistry*, **6**, 443-454.

- Hammer DK, Kickhofen B, Schmid T (1971).** Detection of homocytotropic antibody associated with a unique immunoglobulin class in the bovine species. *Eur. J. Immun.*, **1**, 249-257.
- Harley C (2005).** Telomerase Therapeutics for Degenerative Diseases. *Curr Mol Med.*, **5(2)**, 205–11.
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990).** Telomeres Shorten During Ageing of Human Fibroblasts. *Nature*, **345**, 458-60.
- Harley CB (1997).** Human ageing and telomeres. In: *Telomeres and Telomerase*, Ed.: D.J. Chadwick, G. Cardew, West Sussex: John Wiley and Sons, 129-147.
- Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC (1990).** Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature*, **346(6287)**, 866–8.
- Hayflick L (1961).** Moorhead PS. The Serial Cultivation of Human Telomerase Activity Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res*, **25**, 585–621.
- Hayflick L (1997).** Mortality and immortality at the cellular level. *Biochemistry (Mosc.)*, **62(11)**, 1180–90.
- He Y, Neumann RD, Panyutin IG (2004).** Intramolecular quadruplex conformation of human telomeric DNA assessed with 125I-radioprobe. *Nucleic Acids Res.*, **Oct 8**, **32(18)**, 5359-67.
- Henderson E, Larson D, Melton W (1988).** Structure, synthesis and regulation of telomeres. *Cancer Cells*, **6**, 453–461.
- Herbert BS (2009).** Disruption of telomere homeostasis as a new cancer treatment strategy, *Magazine Of European Medical Oncology (memo)*, **2**, 2124.
- Hirose M, Hashimoto JA, Tahara H, Ide T, Yoshimura T (1998).** New method to measure telomerase activity by transcription-mediated amplification and hybridization protection assay. *Clinical Chemistry*, **44(12)**, 2446-2452.
- Hiyama E ve Hiyama K (2007).** Telomere and telomerase in stem cells. *British Journal of Cancer*, **96**, 1020–1024.
- Holt SE, Norton JC, Wright WE, Shay JW (1996).** Comparison of the telomeric repeat amplification protocol (TRAP) to the new TRAPeze telomerase detection kit. *Methods in Cell Science*, **18**, 237-248.
- Horikawa I, Oshimura M, Barrett JC (1998).** Repression of the telomerase catalytic subunit by a gene on human chromosome 3 that induces cellular senescence. *Molecular Carcinogenesis*, **22**, 65-72.
- Hornsby PJ (2002).** Cellular senescence and tissue aging in vivo. *J Gerontol A Biol Sci.*, **57(7)**, B251-6.

Hug N, Lingner J (2006). Telomere length homeostasis. *Chromosoma.*, **115(6)**, 413–425.

Hurley DJ, Kensinger MH, Mastro AM, Wilson RA (1990). An evaluation of the mononuclear cells derived from bovine mammary gland dry secretions using leukocyte antigen specific monoclonal antibodies, light scattering properties and non-specific esterase staining. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **25**, 177–193.

Husband AJ, Brandon MR, Lascelles AK (1972). Absorption and endogenous production of immunoglobulins in calves. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **50**, 491-498.

Hwang ES (2002). Replicative senescence and senescence-like state induced in cancer-derived cells. *Mech Ageing Dev.*, **123(12)**, 1681-94.

Iwama H, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Hayashi S, Yahata N, Ando K, Toyama K, Hoshika A, Takasaki M, Mori M, Shay JW (1998). Telomeric length and telomerase activity vary with age in peripheral blood cells obtained from normal individuals. *Hum genet.*, **102**, 397-402.

Jarstfer MB, Cech TR (2002). Effects of nucleotide analogues on Euplotes aediculatus telomerase processivity: evidence for product-assisted translocation. *Biochemistry.*, Jan 8, **41(1)**, 151-61.

Jesus BB, Blasco MA (2013). Telomerase at the intersection of cancer and aging. *Trends in Genetics*, September, **29(9)**.

Jiang J, Miracco EJ, Hong K, Eckert B, Chan H, Cash DD, Min B, Zhou ZH, Collins K, Feigon J, 2013: The architecture of Tetrahymena telomerase holoenzyme. *Nature*, **496**.

Jorgensen D (1991). Llama Immunoglobulin G (IgG), and It's Role as an Indicator of Health Status By Published in "Llama Life,".

Jose SS, Bendickova K, Kepak T, Krenova Z, Fric J (2017). *Frontiers in Immunology*, Volume:8. Article Number: 1078. Published: SEP 4.

Kacskovics I, Kis Z, Mayer B, West AP JR, Tiangco NE, Tilahun M, Cervenak L, Bjorkman PJ, Goldsby RA, Szenci O, Hammarström L (2006). FcRn mediates elongated serum half-life of human IgG in cattle. *International Immunology*, **10**, 1-12.

Kalmbach KH, Fontes Antunes DM, Dracxler RC, Knier TW, Seth-Smith ML, Wang F, Liu L, Keefe DL (2013). Telomeres and human reproduction. *Fertil Steril*, Jan, **99(1)**, 239.

Kavalier E, Landman J, Chang Y, Droller MJ, Liu BC (1998). Detecting human bladder carcinoma cells in voided urine samples by assaying for the presence of telomerase activity. *Cancer*, **82**, 708-14.

Kawanishi S, Oikawa S, Murata M, Tsukitome H, Saito I (1999). Site-specific oxidation at GG and GGG sequences in double-stranded DNA by benzoyl peroxide as a tumor promoter. *Biochemistry*, **38**, 16733–16739.

Kehrli ME, Weigel KA, Freeman AE, Thurston JR, Kelley DH (1991). Bovine sire effects on daughters' in vitro blood neutrophil functions, lymphocyte blastogenesis, serum complement and conglutinin levels. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **27**, 303–319.

Kellerman DL, Bruyette DS (1997). Intravenous human immunoglobulin for the treatment of immune-mediated hemolytic anemia in 13 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **11 (6)**, 327-332.

Khan A, Sultan MA, Jalvi MA ve Hussain I (2006). Risk factors of lamb mortality in Pakistan. *Animal Research*, **55**, 301–311.

Kinugawa C, Murakomi T, Okamura K, Yajima A (2000). Telomerase activity in normal ovarias and premature ovarian failure. *Tokahu J Exp Med*, **190**, 231-8.

Kipling D (1995). The telomere. *Oxford Universty Press, Oxford*.

Kim NW, Piatyszek MA, Powse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, **266**, 2011-2015.

Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, Klingelutz AJ (1998). Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature*, **396**, 84–88.

Klapper W, Parwaresch R, Krupp G (2001). Telomere biology in human aging and aging syndromes. *Mech Ageing Dev.*, **122(7)**, 695–712.

Klaus GG, Bennet BA, Jones. EW (1969). A quantitative study of the transfer of colostral immunoglobulins to the newborn calf. *Immunology*, **16**, 293-299.

Kol A (2008). Human intravenous immunoglobulin (IVIG) therapy in veterinary medicine-A review. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, **63 (1)**, 23-27.

Kuby J (1994). Chapter 20 Vaccines. In: J. Kuby (Ed.), *Immunology* (2. Baskı), New York, W. H. Freeman Company, 470-471.

Larson BL. Heary HL Jr, Devery JE (1980). Immunoglobulin production and transport by the mammary gland. *J Dairy Sci.*, **63**, 665-671.

Lin J, Epel E, Cheon J, Kroenke C, Sinclair E, Bigos M, Wolkowitz O, Mellon S, Blackburn (2010). Analyses and comparisons of telomerase activity and telomere length in human T and B cells: Insights for epidemiology of telomere maintenance. *J Immunol Methods*, **352(1–2)**, 71–80.

Liu DY, Peng ZH, Qiu GQ, Zhou CZ (2003). Expression of telomerase activity and oxidative stress in human hepatocellular carcinoma with cirrhosis. *World J Gastroentero*, **9(8)**, 1859-1862.

Logan EF, Pearson GR (1978). The distribution of immunoglobulins in the intestine of the neonatal calf. *Ann Rech Vet.*, **9(2)**, 319-326.

Logan EF, Penhale WJ (1971). Studies on the immunity of the calf to colibacillosis. I. Influence of colostrum whey and immunoglobulin fractions on experimental colisepticaemia. *Vet. Rec.*, **88**, 222-228.

Long S, Argyle DJ, Gault EA, Campbell S, Nasir L (2005). The canine telomerase catalytic subunit (dogTERT): characterisation of the gene promoter and identification of proximal core sequences necessary for specific transcriptional activity in canine telomerase positive cell lines. *Gene. Sep 26*, **358**, 111-20.

Lundblad V, Wright WE (1996). Telomeres and telomerase: a simple picture becomes complex, *Cell*, **87 (1)**, 369-75.

Mach JP, Pahud JJ (1971). Secretory IgG: A major immunoglobulin in most bovine external secretions. *J Immunol*, **106**, 552.

Makarov VL, Hirose Y, Langmore JP (1997). Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell*, **88**, 657-666.

Marcotte R, Wang E (2002). Replicative senescence revisited. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.*, **57(7)**, B257-69.

Marnila P, Korhonen H (2002b). Immunoglobulins. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Elsevier Science Ltd., London, p.: 1950-1956.

Martínez P, Blasco MA (2010). Role of shelterin in cancer and aging. *Aging Cell.*, **9(5)**, 653-66.

Maser RS, Depinho RA (2002). Connecting chromosomes, crisis and cancer. *Science*, **297(5581)**, 565-9.

Massard C, Zermati Y, Pauleau AL, Larochette N, Métivier D, Sabatier L (2006). hTERT: a novel endogenous inhibitor of the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene*, **25**, 4505-4514.

Massimini G, Peli A, Boari A, Britti D (2006a). Evaluation of assay procedures for prediction of passive transfer status in lambs". *American Journal of Veterinary Research*, **67(4)**, 593-598.

McClintock B (1939). The behavior in successive nuclear divisions of chromosome broken at meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **25**, 405-416.

McKevitt TP, Nasir L, Devlin P, Argyle DJ (2002). Telomere lengths in dogs decrease with increasing donor age. *J Nutr., Jun*, **132(6 Suppl 2)**, 1604S-6S.

Mehra R, Marnila P, Korhonen H (2006). Milk immunoglobulins for health promotion. *International Dairy Journal*, **16**, 1262-1271.

Metzger R, Vallbohmer D, Müller-Tidow C, Higashi H, Bollschweiler E, Warnecke-Eberz U, Brabender J, Baldus SE, Xi H, Berdel WE, Serve H, Hoelscher AH, Schneider PM (2009). Increased human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA expression but not telomerase activity is related to survival in curatively resected non-small cell lung cancer. *Anticancer Res. Apr.*, **29(4)**, 1157-62.

Meyerson M (1998). Telomerase enzyme activation and human cell immortalization. *Toxicology Letters*, **102–103**, 41–45.

Miller RA (2000). Telomere diminution as a cause of immune failure in old age: an unfashionable demurral. *Biochem Soc Trans.*, **28(2)**, 241–5.

Mondello C, Petropoulou C, Monti D, Gonos ES, Franceschi C, Nuzzo F (1999). Telomere length in fibroblasts and blood cells from healthy centenarians. *Exp Cell Research*, **248**, 234-42.

Morin GB (1997). Telomere Control of Replicative Lifespan. *Exp Gerontol*, **32**, 375–382.

Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR (1998). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**, 6622-6.

Muller HJ (1938). The re-making of chromosomes. *Collecting Net, Woods Hole*, **13**, 181–198.

Muller LD, Ellinger DK (1981). Colostral Immunoglobulin Concentrations Among Breeds of Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, **64**, 1727-1730.

Muntoni A ve Reddel RR (2005). The first molecular details of ALT in human tumor cells. *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 191–196.

Mutinati M, Pantaleo M, Roncetti M, Piccinno M, Rizzo A. ve Sciorsci RL (2014). Oxidative Stress in Neonatology. *Reproduction In Domestic Animals*, **49(1)**, 7–16.

Nakayama T, Kyo S, Takakura M (1998). et al. hTERT is a critical determinant of telomerase activity in renal-cell carcinoma. *Int J Cancer*, **78**, 539-43.

Nansen P (1972). Selective immunoglobulin deficiency in cattle and susceptibility to infection. *Acta Path. Microbiol. Scand. Section B.*, **80**, 49-54.

Nasir L, Gault E, Campbell S, Veeramalai M, Gilbert D, McFarlane R, Munro A, Argyle DJ (2004). Isolation and expression of the reverse transcriptase component of the *Canis familiaris* telomerase ribonucleoprotein (dogTERT). *Gene. Jul 7*, **336(1)**, 105-13.

Nelson DL, Cox MM (2009). *Princípios de Bioquímica de Lehninger- 7.ed.* 530-699.

Nowak R, Poindron P (2006). From birth to colostrum: early steps leading to lamb survival. *Reprod Nutr Dev.*, **46(4)**, 431-46.

Nugent CI, Lundblad V (1998). The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev.*, **12**, 1073–1085.

Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Nishimaki J, Toyama K, Elbihara Y, Kato H, Wright WE, Shay JW (1997). Cytological detection of telomerase activity using an *in situ* telomeric repeat amplification protocol assay. *Cancer Res.*, **57**, 2100-2103.

Olovnikov A (1973). Theory of Marginotomy. *J. Theor. Biol.*, **41**, 181-90.

Palmero I, Pantoja C, Serrano M (1998). ‘p19ARF’ links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature*, **395**, 125–126.

Pauletti P, Neto RM, Packer IU, D’Arce RD, Bessi R (2003). Quality of colostrum passive immunity and pattern of serum protein fluctuation in newborn calves. *Scientia Agricola*, **60**, 453-456.

Perkins GA ve Wagner B (2015). The development of equine immunity: Current knowledge on immunology in the young horse. *Equine Vet J*, **47**, 267–274. doi:10.1111/evj.12387.

Pfennig F, Kind B, Zieschang F, Busch M, Gutzeit HO (2007). Tert expression and telomerase activity in gonads and somatic cells of the japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Growth Differ*, **50**, 131-141.

Pike RM (1967). Antibody heterogeneity and serological reactions. *Bact. Rev.*, **31**, 157-174.

Porter P (1972). Immunoglobulins in Bovine Mammary Secretions, Quantitative Changes in Early Lactation and Absorption by the Neonatal Calf. *Immunology*, **23**, 225-238.

Prowse KR, Greider CW (1995). Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc Natl Acad, Sci*, **92**, 4818–4822.

Ramunas JE, Yakubov JJ, Brady SY, Corbel C, Holbrook M, Brandt J, Stein JG, Santiago JP, Cooke HMB (2015). Transient delivery of modified mRNA encoding TERT rapidly extends telomeres in human cells. *The FASEB Journal*, **29(5)**, 1930-1939.

Reddel RR (2000). The role of senescence and immortalization in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **21**, 477-484.

Reddel RR (2003). Alternative lengthening of telomeres, telomerase and cancer. *Cancer Lett.*, **194(2)**, 155–62.

Riethman HC, Xiang Z, Paul S, Morse E, Hu XL, Flint J, Chi HC, Grady DL, Moyzis RK (2001). Integration of telomere sequences with the draft human genome sequence. *Nature*, **409**, 948–951.

Riethman H, Ambrosini A, Castaneda C, Finklestein J, Hu XL, Mudunuri U, Paul S, Wei J (2004). Mapping and initial analysis of human subtelomeric sequence assemblies. *Genome Res. Jan*, **14(1)**, 18-28.

Rojas C, Shippen DE (2012). Telomerase regulation. *Mutat Res., Feb 1*, **730(1-2)**, 20-7.

Roy JHB (1980). Factors affecting susceptibility of calves to disease. *Journal of Dairy Science*, **63**, 650-664.

Salmon H (1999). The Mammary gland and neonate mucosal immunity. *Veterinary Immunology and Immunopathology.*, **72**, 143-155.

Schultz RD, Dunne HW, Heist CE (1971). Breed difference in the immune response of newborn calves. *Am. J. Vet. Res.*, **32**, 1337-1341.

Scott-Moncrieff JC, Snyder PW, Reagan WJ, Glickman LT (1997). Intravenous administration of human immune globulin in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **210 (11)**, 1623-1627.

Selk GE (2000). Disease Protection for Baby Calves. *Oklahoma Cooperative Extension Service*, F-3358.

Selk GE (1998). Management factors that affect the development of passive immunity in the newborn calf. *Beef Cattle Handbook-2240, Product of Extension Beef Cattle Resource Committee*, 1-7.

Shall S (1997). The limited reproductive lifespan of normal human cells in culture. In: *Telomeres and Telomerase*, Ed.: D.J. Chadwick, G, Cardew, West Sussex: John Wiley and Sons, p.:112-128.

Shay JW, Wright WE (2005). Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis*, **26**, 867-874.

Shay JW, Wright WE (2007). Hallmarks of telomeres in ageing research. *J Pathol*, **211**, 114–123.

Shay JW, Wright WE (1996). Telomerase activity in human cancer. *Curr Opin Oncol* 1996, **8**, 66-71.

Shay JW, Zou Y, Hiyama E, Wright EW (2001). Telomerase and cancer. *Human Molecular Genetics*, **10**(7), 677-85.

Shay JW, Wright WE (2001). Telomeres and telomerase: implications for cancer and aging. *Radiat Res.*, **155**(1 Pt 2), 188-193.

Shervington A, Patel R (2008). Differential hTERT mRNA processing between young and older glioma patients. *FEBS Lett. May 28*, **582**(12), 1707-10.

Slagboom PE, Droog S, Boomsma DI (1994). Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups. *Am J Hum Genet.*, **55**, 876-882.

Smith JS, Johnson FB (2010). Isolation of G-Quadruplex DNA Using NMM-Sepharose Affinity Chromatography. In Baumann P. (eds), G-Quadruplex DNA: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. **608** DOI 10.1007/978-1-59745-363-9_13, Humana Press.

Sun D, Lopez-Guajardo CC, Quada J, Hurley LD, Von Hoff DD (1999). Regulation of catalytic activity and processivity of human telomerase. *Biochemistry*, **38**, 4037-44.

Tabatabaei S, Nikbakht G, Vatankhah M, Sharifi H, Alidadi N (2013). Variation in colostral immunoglobulin G concentration in fat tailed sheep and evaluation of methods for estimation of colostral immunoglobulin content. *Acta Veterinaria Brno*, **82**, 271– 275.

Tarry-Adkins, JL, Aiken CE, Ashmore TJ, Ozanne SE, Spiroski AM, Sutherland MJ, Camm EJ, Giussani DA, Rolfo A (2019). *Faseb Journal*, Volume: 33. Issue: 1. Pages: 239-253. Published: JAN

Tatematsu K, Nakayama J, Danbara M, Shionoya S, Sato H, Omine M, Ishikawa F (1996). A novel quantitative ‘stretch PCR assay’ that detects a dramatic increase in telomerase activity during the progression of myeloid leukemias. *Oncogene*, **13**, 2265-2274.

Tennant BD, Harrold M, Reing-Guerra RC, Luben (1969). Neonatal alterations in serum gamma globulin levels of Jersey and Holstein-Friesian calves. *Am. J. Vet. Res.*, **30**, 345.

Thatcher EF, Gershwin LJ (1989). Colostral Transfer of Bovine Immunoglobulin E and Dynamics of Serum IgE in Calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **20**, 325-334.

Thewissen M, Linsen L, Geusens P, Raus J, Stinissen P (2005). Impaired activation-induced telomerase activity in PBMC of early but not chronic rheumatoid arthritis patients. *Immunol Lett. Sep 15*, **100**(2), 205-10.

Tizard IR (2004). Veterinary Immunology: An Introduction. (7th ed.). Philadelphia, Pennsylvania: Saunders.

Vatankhah M (2013). Relationship between Immunoglobulin Concentrations in the Ewe's Serum and Colostrum, and Lamb's Serum in Lori-Bakhtiari Sheep". *Iranian Journal of Applied Animal Science*, **3(3)**, 539-544.

Von Zglinicki T, Saretzki G (2002). Replicative Aging, Telomeres, and Oxidative Stres. *Ann NY Acad Sci*, **959**, 24–29.

Von Zglinicki T, Pilger R, Sitte N (2000). Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radic Biol Med*, **28**, 64–74.

Von Zglinicki T, Saretzki G, Döcke W, Lotze C (1995). Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence. *Exp Cell Res*, **220**, 186–193.

Wai LK (2004). Telomeres, Telomerase and Tumorigenesis A Review. *MedGenMed*, **6**, 19.

Waldman, TA (1969). Disorders of immunoglobulin metabolism. *New Engl. J. Med.*, **281**, 1170-1177.

Waldner C, Rosengren LB (2009). Factors associated with serum immunoglobulin levels in beef calves from Alberta and Saskatchewan and association between passive transfer and health outcomes. *Can Vet J*, **50(3)**, 275-281.

Wallace MM, Jarvie, BD, Perkins NR, Leslie KE (2006). A comparasion of serum harvesting methods and type of refractometer for determining total solids to estimate failure of passive transfer in calves. *Can Vet J.*, **47**, 572-575.

Weng NP, Granger L, Hodes RJ (1997). Telomere lengthening and telomerase activation during human B cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **94(20)**, 10827–32.

Wilkie BN (1974). Review of Bovine Immunology for the Veterinary Practitioner. *Can Vet Journal*, **15(9)**, 243-248.

Williams RC, Gibbons RJ (1972). Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: A mechanism of antigen disposal. *Science*, **177**, 697-699.

Wittum TE, Perino LO (1995). Passive immun status at postpartum hour 24 and long-term health and performance of calves. *Am J Vet Res*, **56(9)**, 1149-1154.

Wong JM, Collins K (2003). Telomere maintenance and disease. *Lancet.*, **362(9388)**, 983–8.

Wright WE, Shay JW (2005). Telomere biology in aging and cancer. *Jam Geriatr Soc.*, **53**, 292–294.

Wyatt HDM, West SC, Beattie TL (2010). InTERTpreting telomerase structure and function. *Nucleic Acids Res.*, **38(17)**, 5609–22.

- Yajima T, Yagihashi A, Kameshima H, Kobayashi D, Furuya D, Hirata K (1998).** Watanabe N Quantitative reverse transcription-PCR assay of the RNA component of human telomerase using the TaqMan fluorogenic detection system. *Clinical Chemistry*, **44(12)**, 2441-2445.
- Yamada O, Oshimi K, Motoji T, Mizoguchi H (1995).** Telomeric DNA in normal and leukemic blood cells. *J Clin Invest. Mar*, **95(3)**, 1117-23.
- Yamanaka H, Hagiwara K, Kirisawa R, Iwai H (2003b).** Proinflammatory Cytokines in Bovine Colostrum Potentiate the Mitogenic Response of Peripheral Blood Mononuclear Cells from Newborn Calves through IL-2 and CD25 Expression. *Microbiology and Immunology*, **47(6)**, 461-468.
- Zakian VA (1995).** Telomeres: Beginning to understand the end. *Science*, **270**, 1601-6.
- Zarrili A, Micera E, Lacarpia N, Lombardi P, Pero ME, Pelagalli A, d'Angelo D, Mattia M, Avallone L (2003).** Evaluation of ewe colostrum quality by estimation of enzyme activity levels. *Revue Med Vet.*, **154(8-9)**, 521-523.
- Zavlaris M, Angelopoulou K, Vlemmas I, Papaioannou N (2009).** Telomerase reverse transcriptase (TERT) expression in canine mammary tissues: a specific marker for malignancy. *AnticancerRes., Jan*, **29(1)**, 319-25.
- Zheng P-S, Iwasaka T, Yamasaki F, Ouchida M, Yokoyama M, Nakao Y, Fukuda K, Matsuyama T, Sugimori H (1997).** Telomerase activity in gynecologic tumors. *Gynecologic Oncology*, **64**, 171-5.
- Ziparsky A, Brown EJ, Bienenstock J (1973).** Lack of opsonization potential of ill human secretory. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **142**, 181-184.