



The Effect of Enrofloxacin and Caffeic Acid Phenethyl Ester on Oxidant and Antioxidant Status in the Blood in *Ornithobacterium rhinotracheale* Infection

Fulya BENZER¹ Mine ERİŞİR² Ayşe KILIÇ³ Bülent TAŞDEMİR⁴
Osman GÜLER⁵ Halil ŞİMŞEK⁶ Sema TEMİZER OZAN²

¹ Munzur University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Tunceli, Turkey

² Fırat University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Elazığ, Turkey

³ Fırat University, Sivrice Vocational School, Elazığ, Turkey,

⁴ Veterinary Control and Research Institute, Elazığ, Turkey

⁵ Munzur University, Pertek Sakine Genç Vocational School, Tunceli, Turkey,

⁶ Bingöl University, Health Care Vocational School, Bingöl, Turkey

Received: 13.04.2017

Accepted: 22.06.2017

SUMMARY

The effects of enrofloxacin and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) alone and in combination applications on the free radical damage and antioxidant system changes occurring in the blood of broilers in *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) infection were investigated. For this study, 96 broilers aged 4 weeks were divided in 8 groups. These 8 groups are respectively, I. Control Group, II. Antibiotic Group, III. CAPE Group, IV. Antibiotic + CAPE Group, V. ORT Group, VI. ORT + Antibiotic Group, VII. ORT + CAPE Group, VIII. ORT + CAPE + Antibiotic Group. An inoculum of the ORT 3263/91 strain (serotype A) containing 3.8×10^8 CFU mL⁻¹ was given as aerosol to the groups V-VIII. For groups, CAPE and Antibiotic applications were started at the same time on 17th day after ORT applications. For 6 days, enrofloxacin (10 mg/kg/day) was added to the drinking water of the groups II, IV, VI, VIII and CAPE (10 µmol/kg) was implemented as i.p to the groups III, IV, VII, VIII. As a result, infection of ORT increased the levels of serum MDA and β-karoten (p<0.01), and decreased the activities of GSH-Px ve CAT (p<0.001) from the antioxidant enzymes. Given CAPE alone and with antibiotic to the control group causes to raise the level of MDA (p<0.05). While antibiotic, CAPE, and antibiotic + CAPE applications caused a significant reduction on the activity of CAT (p<0.01), the activities of GR (p<0.05) and GSH-Px (p<0.01) were increased. Applying antibiotic and CAPE separately to the control group causes to reduce the level of NO (p<0.05). Application of antibiotic and CAPE separately to the ORT group caused to decrease with statistically insignificant in the level of MDA. Applications of antibiotic, CAPE, and antibiotic + CAPE caused to reduce in the CAT activity (p<0.05), alone CAPE and together with antibiotic caused to reduce in ALT activity (p<0.001), and alone CAPE caused to reduce in level of Vit E (p<0.05). Applications of alone antibiotic and CAPE caused to reduce in the AST activity, when they were applied together the decrease in the level of AST was found statistically significant (p<0.05). Also, applications of alone KAFE and together with antibiotic caused a significant increase in the GR activity (p<0.01). The application of CAPE in the ORT infection has beneficial effects on the systemic oxidant and antioxidant balance.

Key Words: *Ornithobacterium rhinotracheale*, Enrofloxacin, Caffeic acid phenethyl ester, Blood, Oxidant-antioxidant status

ÖZET

Ornithobacterium rhinotracheale Enfeksiyonunda Kandaki Oksidan ve Antioksidan Durum Üzerine Enrofloksasin ve Kafeik Asit Fenetil Ester'in Etkisi

Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) enfeksiyonunda broylerlerin kanında meydana gelen serbest radikal hasarı ve antioksidan sistemdeki değişim üzerine enrofloksasin ve kafeik asit fenetil ester (KAFE)'nin tek başına ve birlikte uygulanmasının etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. 4 haftalık 96 adet civciv 8 gruba bölündü. I. Kontrol Grubu, II. Antibiyotik Grubu, III. KAFE Grubu, IV. Antibiyotik + KAFE Grubu, V. ORT Grubu, VI. ORT + Antibiyotik Grubu, VII. ORT + KAFE Grubu ve VIII. ORT + Antibiyotik + KAFE Grubu. ORT 3263/91 suşu (serotip A) mililitre başına 3.8×10^8 CFU içeren inokulum aerosol olarak verildi (Grup V-VIII). Gruplara antibiyotik ve KAFE uygulanmasına ORT verilmesinden sonraki 17. günde aynı zamanda başlatıldı. 6 gün süre ile enrofloksasin (10 mg/kg/gün) içme sularına katıldı (Grup II, IV, VI, VIII), KAFE (10 µmol/kg) i.p olarak uygulandı (Grup III, IV, VII, VIII). ORT enfeksiyonu serum MDA ve β-karoten düzeyinde artışa (p<0.01), antioksidan enzimlerden GSH-Px ve KAT aktivitesinde azalmaya (p<0.001) neden olmuştur. Kontrol grubuna tek başına KAFE'nin veya Ant ve KAFE'nin birlikte verilmesi MDA düzeyinde artışa sebep olmuştur (p<0.05). Yine Ant, KAFE, Ant + KAFE uygulaması KAT aktivitesinde önemli azalmaya (p<0.01) neden olurken, GR (p<0.05) ve GSH-Px (p<0.01) aktivitesinde ise artışa neden olmuştur. Kontrol grubuna tek başına Ant ve KAFE uygulanması NO düzeyinde önemli azalmaya (p<0.05) sebep olmuştur. ORT grubunda tek başına Ant ve KAFE'nin uygulanması MDA artışında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir düşüşe neden olmuştur. Ant, KAFE, Ant+KAFE uygulaması KAT aktivitesinde (p<0.05), tek başına KAFE veya Ant ve KAFE'nin birlikte verilmesi ALT aktivitesinde (p<0.001) ve tek başına KAFE Vit E düzeyinde (p<0.05) önemli azalmaya sebep olmuştur. Ant ve KAFE tek başına AST aktivitesinde azalmaya sebep olmuş, Ant ve KAFE birlikte verildiği zaman bu azalma istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05). Ayrıca tek başına KAFE veya Ant ve KAFE'nin birlikte verilmesi GR aktivitesinde ise önemli artışa neden olmuştur (p<0.01). ORT enfeksiyonunda tek başına KAFE uygulamasının sistemik oksidan-antioksidan denge üzerine olumlu etkileri vardır.

Anahtar Kelimeler: *Ornithobacterium rhinotracheale*, Enrofloksasin, Kafeik asit fenetil ester, Kan, Oksidant-antioksidant durum

GİRİŞ

Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) gram negatif bir bakteri olup kanatlılarda pnömoni, trakeit ve hava kesesi iltihabı ile karakterize solunum yolu hastalığına neden olur (Hinz ve ark. 1994). Hem güvercin, sülün, keklik, şahin gibi vahşi kuşların hem de ekonomik olarak önemli kanatlı türlerinin ORT enfeksiyonuna duyarlı olduğu veya ORT taşıdığı bilinmektedir (Thieme ve ark. 2016). *Ornithobacterium rhinotracheale* tavuk ve hindilerde primer patojen etken olup, oluşturduğu hastalık kısaca ORT olarak isimlendirilmektedir (Sprenger ve ark. 1998; Van Veen ve ark. 2000). Bu bakteri ile enfeksiyon artan tedavi masraflarının yanı sıra yumurta üretiminde azalma, büyümede gerileme, artmış mortalite ve yemden yararlanma oranında azalmadan dolayı yüksek ekonomik kayıplara neden olur (Van Empel ve Hafez 1999).

Kanatlı sektöründe bakteriyel hastalıkların önlenmesi, sağaltımı ve yayılma oranının düşürülmesi amacıyla çeşitli antibakteriyeller kullanılmaktadır. Sentetik bir florokinolon olan enrofloksasin, veteriner hekimlikte solunum ve sindirim yolu enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır (Anadón ve ark. 1995). Enrofloksasin, florokinolon karboksilik bir antibakteriyel ajandır ve DNA girazı inhibe ederek bakterilerin DNA replikasyonunu, dolayısıyla DNA sentezini engelleyerek bakteriositik etki gösterir (Fernandes 1988).

Reaktif oksijen türleri (ROS) yaşayan organizmalar tarafından doğal olarak üretilir. Oksijenden üretilen en iyi bilinen reaktif oksijen türleri; süperoksit anyonu, hidroksil radikali, hidrojen peroksit, nitrik oksit (NO) ve peroksinitrittir. Normal fizyolojik koşullar altında, ROS oluşumu ve süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz gibi enzimatik, glutatyon ve A, E, C vitaminleri gibi enzimatik olmayan antioksidanlar arasında bir denge vardır. Aşırı miktarda ROS üretimi ve/veya yetersiz antioksidan savunma nedeniyle bu denge bozulduğunda oksidatif stres ortaya çıkar. Oksidatif stresin en büyük indikatörü lipid peroksidasyonudur. Malondialdehit (MDA), oksidatif stres altında oluşan lipid peroksidasyonunun en çok bilinen ve basit bir testi olup klinik uygulamalarda en faydalı olanıdır (Yazar ve ark. 2010).

Kafeik asit fenetil esteri (KAPE), bal arılarının propolisinden ekstrakte edilen doğal flavonoid bir bileşiktir. KAFE immünomodülatör, antiinflamatuvar, karsinostatik, antiviral, antimikrobiyal ve antioksidan özelliklere sahiptir (Koksel ve ark. 2006; Wang ve ark. 2013). KAFE ksantin oksidaz ve nitrik oksit sentaz aktivitesini inhibe ederek, SOD aktivitesinin tükenmesini engelleyerek, reaktif oksijen türlerini temizleyerek ve lipid peroksidasyonu baskılayarak antioksidan özellik göstermektedir (Koksel ve ark. 2006).

ORT enfeksiyonunun broilerlerde oksidant ve antioksidanlarda değişimlere sebep olduğu ve dengenin oksidatif strese doğru meyillendiği bilinmektedir (Benzer ve Yılmaz, 2009). Bu çalışmada broilerlerde ORT enfeksiyonu sonucu kanda meydana gelen serbest radikal hasarı ve antioksidan sistemdeki değişim üzerine Enrofloksasin ve KAFE'nin tek başına ve birlikte uygulanmasının etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Etken

Ornithobacterium rhinotracheale B 3263/91 (serotip A) suşu, Dr. Hafez Mohamed Hafez, Institute of Poultry

Diseases, Free University Berlin, Almanya'dan temin edildi. ORT B 3263/ 9 (serotip A) suşundan inokulum hazırlandı. Bakterinin %7 kanlı agara ekimi yapıldı, % 5-10 CO₂ 'li ortamda 48 saat inkube edildi. Bakteriyel süspansiyon 3.8x10⁸ coloni forming ünitesi (cfu/ml) olarak civcivleri infekte etmek için kullanıldı. Kültür izolasyonu için, akciğer ve trachea örnekleri aseptik olarak %7 koyun kanı içeren BHIA ve MacConkey agara ekim yapıldı. 48 saat %5- 10 CO₂'lik atmosferde mikroaerofilik ortamda üremeye bırakıldılar. Bakterinin identifikasyonu koloni morfolojisi, gram boyama ve biyokimyasal testlere göre yapıldı.

ORT suşunun Antibiyotik Duyarlılık Testi

Oksitetrasiklin, Enrofloksasin, Amoksisilin-Klavulanik asit, Gentamisin, Eritromisin, Trimetoprim-Sülfametoksazol, Ampisilin, Streptomisin, Penisilin ve Sefaleksim etken maddelerini içeren antibiyotik diskleri firmalardan temin edilerek antibiyogram testinde kullanıldı. *Ornithobacterium rhinotracheale* suşunun antibiotiklere duyarlılığı Kirby Bauer Disk Diffüzyon Yöntemine (Bauer ve ark. 1966) göre yapıldı. Mueller Hinton Agar (Merck) besi yeri üzerine antibiyotik diskleri (Oksitetrasiklin, Enrofloksasin, Amoksisilin-Klavulanik asit, Gentamisin, Eritromisin, Trimetoprim-Sülfametoksazol, Ampisilin, Streptomisin, Penisilin ve Sefaleksim) yerleştirildi ve 37 °C'de 24 saat inkube edildi. Bir gecelik inkubasyondan sonra petriyelerdeki inhibisyon zon çapları cetvel ile ölçüldü. The National Committe for Clinical Laboratory Standarts (NCCLS)'in önerdiği duyarlı ve dirençli sınırlarına göre değerlendirme yapıldı. Yapılan antibiyogram testi sonucu en duyarlı antibiyotiğin Enrofloksasin olduğu belirlendi.

Deney aşaması

Çalışmamızda yerel etik kurulu onayı alındıktan (Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Elazığ Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Hayvan Deneyle Yerel Etik Kurulu, No: 23.10.2008-6) sonra kuluçkadan çıkan 100 adet civciv önceden dezenfekte edilmiş binaya alınarak 4 haftalık olana kadar civciv büyütme yemi ile büyütüldüler. Daha sonra 48 adet civciv bir başka binaya alınarak, 4 ayrı bölmeye ayrıldı, bu civcivlere ORT 3263/91 suşu (serotip A) verildi. Diğer 48 civciv ise kontrol olarak ilk alındıkları binada kaldılar, bu civcivler de 4 ayrı bölmeye ayrıldılar. Gruplara enrofloksasin ve KAFE uygulaması, civcivler 4 haftalık olduktan sonraki 17. günde aynı zamanda başlatıldı. Gruplar;

- I. Kontrol grubu; Normal civciv büyütme yemi ile deney süresince bakım ve beslenmesi yapıldı.
- II. Antibiyotik grubu; Enrofloksasin (10mg/kg/gün), 6 gün süre ile tek başına içme sularına katıldı.
- III. KAFE grubu; 6 gün boyunca KAFE (10µmol/kg) i.p olarak uygulandı.
- IV. Antibiyotik + KAFE grubu; Enrofloksasin (10mg/kg/gün) içme suyuna katılarak, KAFE (10 µmol/kg) i.p olarak 6 gün süre ile uygulandı.
- V. ORT grubu; ORT 3263/91 suşu (serotip A) mililitre başına 3,8X10⁸ CFU içeren inokulum aerosol olarak verildi.
- VI. ORT + Antibiyotik grubu; ORT 3263/91 suşu (serotip A) mililitre başına 3.8x10⁸ CFU içeren inokulum aerosol olarak verildi, 17. günde enrofloksasin uygulanmasına başlandı ve 6 gün süre ile tek başına enrofloksasin (10 mg/kg/gün) içme sularına katıldı.
- VII. ORT + KAFE grubu; ORT 3263/91 suşu (serotip A) mililitre başına 3.8x10⁸ CFU içeren inokulum aerosol olarak verildi, 17. günde KAFE (10 µmol/kg i.p

olarak) uygulanmasına başlandı ve uygulama 6 gün sürdü.

VIII. ORT+ Ant + KAFE grubu; ORT 3263/91 suşu (serotip A) mililitre başına 3.8×10^8 CFU içeren inokulum aerosol olarak verildi, 17. günde enrofloksasin (10 mg/kg/gün) içme sularına katılarak, KAFE (10 μ mol/kg) i.p olarak 6 gün süre ile uygulandı.

Enrofloksasin ve KAFE uygulaması sonunda, 7. günde piliçler kesilerek kanları alındı.

Kan Örneklerinin Alınması ve Hazırlanması

Kan örnekleri iki adet EDTA'lı deney tüpüne alınarak, en kısa zamanda laboratuvara getirilmiştir. EDTA'lı kanlardan biri tam kan olarak ayrılmış (GSH ve GSH-Px tayini için), diğeri 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra plazmaları ayrılmış (MDA, NO, E vitamini, A vitamini ve β -karoten, ALT, AST tayini için) ve geride kalan eritrosit paketi serum fizyolojik ile 3 defa yıkanmıştır (SOD ve CAT tayini için). Tüm bu numuneler daha sonra çalışılmak üzere -80 °C'de muhafaza edilmiştir

Analizler

Hazırlanan kan örneklerinde SOD (Sun ve ark. 1988), GSH-Px (Lawrence ve Burk 1976), CAT (Aebi, 1984), ALT ve AST (Reitman ve Frankel 1957) aktivitesi ile MDA (Placer ve ark. 1966), GSH (Chavan ve ark. 2005), NO (Lyll ve ark. 1995), E vitamini (Kayden ve ark. 1973), A vitamini ve β -karoten (Suzuki ve Katoh 1990) ile hemoglobin (Fairbanks ve Klee 1986) düzeyleri spektrofotometrik yöntemlerle ölçüldü.

İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmanın istatistiksel analizlerinde SPSS 12.0 paket programı kullanıldı. Gruplar arası farklılığın önemi tek yönlü ANOVA ile grup içindeki farklılıkların derecesi

Duncan testi, iki grup arasındaki farklılığın derecesi bağımsız t-testi ile analiz edildi. Veriler; ortalama \pm standart hata olarak gösterildi ve anlamlılıkları $p < 0.05$ esas alınarak değerlendirildi.

BULGULAR

ORT infeksiyonu plazma MDA ve β -karoten düzeyinde artışa ($p < 0.01$), antioksidan enzimlerden GSH-Px ve KAT aktivitesinde azalmaya ($p < 0.001$) neden olmuştur. ORT infeksiyonu SOD, GR aktiviteleri ile GSH, NO, AST, ALT, Vit A, Vit E düzeylerini etkilememiştir (Tablo 1, 2).

Kontrol grubuna tek başına KAFE'nin veya Ant ve KAFE'nin birlikte verilmesi MDA düzeyinde artışa sebep olmuştur ($p < 0.05$). Yine Ant, KAFE, Ant + KAFE uygulaması KAT aktivitesinde önemli azalmaya ($p < 0.01$) neden olurken, GR ($p < 0.05$) ve GSH-Px ($p < 0.01$) aktivitesinde ise artışa neden olmuştur (Tablo 3). Kontrol grubuna tek başına Ant ve KAFE uygulanması NO düzeyinde önemli azalmaya ($p < 0.05$) sebep olmuştur (Tablo 4).

ORT grubunda tek başına Ant ve KAFE'nin uygulanması MDA artışında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir düşüşe neden olmuştur. Ant, KAFE, Ant+KAFE uygulaması KAT aktivitesinde ($p < 0.05$), tek başına KAFE veya Ant ve KAFE'nin birlikte verilmesi ALT aktivitesinde ($p < 0.001$) ve tek başına KAFE Vit E düzeyinde ($p < 0.05$) önemli azalmaya sebep olmuştur. Ant ve KAFE tek başına AST aktivitesinde azalmaya sebep olmuş, Ant ve KAFE birlikte verildiği zaman bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Ayrıca tek başına KAFE veya Ant ve KAFE'nin birlikte verilmesi GR aktivitesinde ise önemli artışa neden olmuştur ($p < 0.01$) (Tablo 5, 6).

Tablo 1. ORT infeksiyonunun broilerlerin kanındaki serbest radikal hasarı ve antioksidan sistem üzerine etkileri
Table 1. The effects of ORT infection on free radical damage and antioxidant system in the blood of broilers

	MDA nmol/ml	SOD U/g Hb	GSH-Px U/g Hb	CAT k/g Hb	GSH-Rd U/ g Hb	GSH nmol/ml
Kontrol	3.19 \pm 0.03 ^a	0.47 \pm 0.03	38.39 \pm 1.94 ^b	10.44 \pm 0.36 ^b	4.69 \pm 0.61	0.38 \pm 0.02
ORT	4.18 \pm 0.24 ^b	0.40 \pm 0.04	20.71 \pm 1.57 ^a	8.07 \pm 0.15 ^a	4.98 \pm 0.42	0.39 \pm 0.01
P	<0.01	>0.05	<0.001	<0.001	>0.05	>0.05

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir.

Tablo 2. ORT infeksiyonunun broiler kanındaki bazı biyokimyasal parametreler üzerine etkileri
Table 2. The effects of ORT infection on some biochemical parameters in the blood of broilers

	NO μ mol/L	AST U/L	ALT U/L	β -Karoten μ g/dl	Vit A μ g/dl	Vit E μ g/dl
Kontrol	66.93 \pm 0.29	30.14 \pm 2.17	1.92 \pm 0.07	247.13 \pm 13.57 ^a	28.67 \pm 3.47	0.28 \pm 0.03
ORT	66.40 \pm 0.14	28.22 \pm 1.34	1.96 \pm 0.11	340.92 \pm 17.64 ^b	28.01 \pm 1.09	0.24 \pm 0.03
P	>0.05	>0.05	>0.05	<0.01	>0.05	>0.05

Tablo 3. Antibiyotik ve KAFE uygulamasının sağlıklı broiler kanındaki serbest radikal hasarı ve antioksidan aktivite üzerine etkileri

Table 3. Effects of antibiotic and CAFE application on free radical damage and antioxidant activity in the blood of healthy broilers

	MDA nmol/ml	SOD U/g Hb	GSH-Px U/g Hb	CAT k/g Hb	GSH-Rd U/ g Hb	GSH nmol/ml
Kontrol	3.19 \pm 0.03 ^a	0.47 \pm 0.03	38.39 \pm 1.94 ^{ab}	10.44 \pm 0.36 ^b	4.69 \pm 0.61 ^a	0.38 \pm 0.02
K + A	3.42 \pm 0.29 ^a	0.60 \pm 0.05	44.55 \pm 4.59 ^{bc}	7.27 \pm 0.70 ^a	5.59 \pm 0.27 ^{ab}	0.33 \pm 0.01
K + KAFE	3.76 \pm 0.24 ^{ab}	0.60 \pm 0.03	54.12 \pm 6.33 ^c	7.82 \pm 0.60 ^a	6.11 \pm 0.23 ^b	0.36 \pm 0.01
K+A+KAFE	4.33 \pm 0.33 ^b	0.50 \pm 0.05	48.01 \pm 3.57 ^c	8.08 \pm 0.44 ^a	6.30 \pm 0.28 ^b	0.34 \pm 0.01
P	<0.05	>0.05	<0.01	<0.01	<0.05	>0.05

Tablo 4. Antibiyotik ve KAFE uygulamasının sağlıklı broiler kanındaki bazı biyokimyasal parametreler üzerine etkileri
Table 4. Effects of antibiotic and CAFE application on some biochemical parameters in the blood of healthy broilers

	NO µmol/L	AST U/L	ALT U/L	β -Karoten µg/dl	Vit A µg/dl	Vit E µg/dl
Kontrol	66.93±0.29 ^b	30.14±2.17	1.92±0.07	247.13±13.57	28.67±3.47	0.28±0.03
K+Ant	65.84±0.17 ^a	28.70±2.06	1.77±0.39	263.40±27.17	24.60±1.89	0.27±0.01
K+KAFE	65.86±0.17 ^a	25.72±1.13	2.59±0.32	253.17±16.91	20.43±1.50	0.37±0.04
K+Ant+KAFE	66.46±0.34 ^{ab}	25.63±1.53	1.77±0.09	235.88±6.84	25.82±4.45	0.24±0.04
P	<0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

Tablo 5. Antibiyotik ve KAFE uygulamasının ORT ile enfekte broiler kanındaki serbest radikal hasarı ve antioksidan aktivite üzerine etkileri

Table 5. Effects of antibiotic and CAFE application on free radical damage and antioxidant activity in the blood of broiler infected by ORT

	MDA nmol/ml	SOD U/g Hb	GSH-Px U/g Hb	CAT k/g Hb	GSH-Rd U/ g Hb	GSH nmol/ml
ORT	4.18±0.24	0.40±0.04	20.71±1.57	8.07±0.15 ^b	4.98±0.42 ^a	0.39±0.01
ORT+Ant	3.44±0.26	0.44±0.05	15.86±2.76	6.38±0.55 ^a	4.47±0.50 ^a	0.38±0.01
ORT+ KAFE	3.65±0.16	0.55±0.07	14.96±2.38	7.22±0.52 ^{ab}	6.86±0.53 ^b	0.38±0.01
ORT+Ant+KAFE	4.12±0.32	0.48±0.03	16.48±2.74	6.18±0.26 ^a	7.22±0.84 ^b	0.37±0.01
P	>0.05	>0.05	>0.05	<0.05	<0.01	>0.05

Tablo 6. Antibiyotik ve KAFE uygulamasının ORT ile enfekte broiler kanındaki bazı biyokimyasal parametreler üzerine etkileri

Table 6. Effects of antibiotic and CAFE application on some biochemical parameters in the blood of broiler infected by ORT

	NO µmol/L	AST U/L	ALT U/L	β -Karoten µg/dl	Vit A µg/dl	Vit E µg/dl
ORT	66.40±0.14	28.22±1.34 ^b	1.96±0.11 ^b	340.92±17.64	28.01±1.09	0.24±0.03 ^b
ORT+Ant	65.84±0.25	25.15±1.13 ^{ab}	1.77±0.23 ^b	373.87±38.94	24.39±3.53	0.24±0.02 ^b
ORT+KAFE	66.40±0.25	26.11±0.57 ^{ab}	0.81±0.14 ^a	352.15±45.14	26.37±2.28	0.15±0.01 ^a
ORT+Ant+KAFE	66.61±0.28	23.42±0.91 ^a	1.10±0.19 ^a	336.35±28.04	25.82±1.38	0.20±0.01 ^{ab}
P	>0.05	<0.05	<0.001	>0.05	>0.05	<0.05

TARTIŞMA ve SONUÇ

Oksidatif stres durumunda, lipid peroksidasyonun ana yan ürün aldehytlerinden biri olan MDA, dokularda ve periferik dolaşımda birikir (Palanisamy ve ark. 2011). İnsan ve hayvanlarda otitis media, tonsillit, tüberküloz, pnemoni gibi çeşitli bakterial üst ve alt solunum yolu enfeksiyonlarında periferik dolaşımda MDA seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (Gündoğdu ve Ertekin, 2006; Lamsal ve ark. 2007; Dwivedi ve ark. 2009; Palanisamy ve ark. 2011). Yükselen MDA seviyeleri yoğun oksidatif stresin kanıtıdır (Yazar ve ark. 2010). Bu çalışmada da plazma MDA düzeyinde artış saptanmış olup bu artış kanatlı solunum yolu hastalığı olan ORT enfeksiyonunun da oksidatif strese sebep olduğuna işaret etmektedir.

Sürekli ROS oluşumu ile baş etmek için, hücrelerde enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar bulunur. Bu antioksidan savunma sistemi özellikle SOD, CAT, GSH-Px ve GR'ı kapsayan anahtar antioksidanları içerir (Yazar ve ark. 2010). Ratlarda çeşitli bakterilerin sebep olduğu pnemonide ve akciğer hasarında, akciğerlerde SOD, GSH-Px, CAT aktivitesi ve GSH seviyesinin azaldığı, antioksidan savunma sistemlerinin zayıflamasının ve oksidan-antioksidan durumdaki değişikliklerin bakterilerin sebep olduğu akciğer hasarında önemli rol aldığı bildirilmiştir (Suntres ve ark. 2002; Dwivedi ve ark. 2009). Yine tüberküloz, pnemonili insan ve ratların kanlarında da antioksidan enzim (CAT, SOD) aktivitelerinde, E ve C vitamini düzeylerinde azalmalar tespit edilmiştir (Lamsal ve ark. 2007; Dwivedi ve ark. 2009). Bu çalışmada da ORT enfeksiyonunda broilerlerin kanında antioksidan

enzimlerden GSH-Px ve KAT aktivitesinde azalma tespit edilmiştir. *M. tuberculosis* ile enfekte kobaylarda serum total antioksidan kapasitenin tükendiği ve konakçının antioksidan savunmalarının tükenmesinin in vivo oksidatif stresin sebebi olduğu bildirilmiştir (Palanisamy ve ark. 2011).

Yağda çözünen bir vitamin olan A vitamini, bağışıklık, hücrel farklılaşma, solunum ve gastrointestinal epitel yüzeylerinin korunması, büyüme, üreme ve görme için esansiyeldir. Aynı zamanda A vitamini hem antioksidan hem de antiinfektif vitamin olarak da bilinir (Semba, 1994). ORT enfeksiyonunda serum β-karoten seviyesinde artış bulunmuştur. *S. Pneumoni* ile enfekte farelerin akciğer retinol düzeyleri de yüksek bulunmuştur (Restori ve ark. 2014). Hermes-Lima ve ark. (1998) antioksidan savunmalarının aktivasyonunun, oksiradikallerin üretimini azaltmak için oksidatif strese karşı koruyucu bir mekanizma olduğunu önermişlerdir. Ünal ve arkadaşları (Unal ve ark. 2002) ise vitamin A'nın solunum yolu epitelleri için esansiyel olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada β-karoten seviyesinde saptanan bu artış solunum yolu epitellerini oksidatif strese karşı korumada görev alabilir.

Antibiyotiklerin organizmadaki oksidatif durumu etkilediği gösterilmiştir (Rizzo ve ark. 2009). Antimikrobiyal ajanlardan enrofloksasin, karaciğer mikrozomal enzimlerinden olan sitokrom P450 tarafından okside edilir, bu oksidasyon sırasında üretilen serbest radikaller lipid peroksidasyona neden olmaktadır (Gürbay ve ark. 2001). Enrofloksasinin karaciğerde ROS ve MDA'yı artırdığı ve total antioksidan kapasiteyi ise azalttığı tespit

edilmiştir (Liu ve ark. 2015). Bu çalışmada enrofloksasinin periferel dolaşımdaki MDA düzeyleri üzerine etkisiz olduğu fakat kan CAT aktivitesinde önemli azalmaya, GSH-Px ve GR düzeylerinde ise önemsiz artışa sebep olduğu tespit edilmiştir. Benzer olarak Altınordu ve Eraslan (2009), broilerlerde kinolon antibiyotiklerinin etkileri üzerine yaptıkları çalışmada tedavi edici dozlarda verilen enrofloksasinin plazmada MDA düzeylerini etkilemediğini, enrofloksasinin uygulamasının 1. gününde CAT aktivitesinde önemli azalmanın olduğunu bildirmişlerdir. Broilerlerde terapötik dozlardaki enrofloksasinin her ne kadar periferel MDA düzeyini etkilemese de antioksidanlarda değişimlere sebep olduğunu ve sistemik antioksidan dengeyi bozduğunu söyleyebiliriz. ORT enfeksiyonunda ise enrofloksasinin uygulanması artan MDA düzeylerinde önemsiz azalmaya sebep olduğundan, enfeksiyon durumunda enrofloksasinin kullanılması serbest radikal hasarını önlemesi açısından faydalı olabilir. ORT enfeksiyonunda enrofloksasinin uygulanması azalan CAT aktivitesinin tekrar önemli azalmasına sebep olduğundan, kan CAT aktivitesi tükenebilir.

KAFE propolisten elde edilen aktif bir antioksidan bileşen olup akciğer kanseri, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, astım gibi bazı solunum yolu hastalıklarında faydalı etkilere sahiptir (Sırmalı ve ark. 2013; Ma ve ark. 2016;). Ratlarda *Salmonella typhimurium* lipopolisakariti (endotoksin) verilerek oluşturulan akut akciğer hasarında, deneysel akciğer travmalarında, iskemi-reperfüzyon sonrası akciğer hasarında serum ve akciğer dokusunda artan MDA düzeylerini KAFE azaltmaktadır (Calikoglu ve ark. 2003; Koksel ve ark. 2006; Sırmalı ve ark. 2013). Bu çalışmada da ORT'li gruba tek başına KAFE uygulanması serum MDA'sında istatistik olarak önemsiz azalmaya sebep olmuştur. KAFE'nin uygulanması hem kontrol hemde ORT'li grupta glutatyon redüktaz enziminde, yine kontrol grubunda GSH-Px aktivitesinde önemli artışa sebep olmuştur. Önceki çalışmalarda KAFE'nin antioksidan enzimler gibi rol alarak serbest oksijen radikallerini azalttığı ve serbest radikal temizleyen enzimlerin tükenmesini engellediği gösterilmiştir (Calikoglu ve ark. 2003; Ozyurt ve ark. 2004; Yıldız ve ark. 2008). Tek başına KAFE uygulaması ORT sonucu azalan GSH-Px ve CAT aktivitelerinin istatistik olarak değişmemesini sağlamıştır. Yine ORT'li grupta tek başına KAFE uygulamasının vitamin E düzeylerinde azalmaya sebep olması, KAFE varlığında nonenzimatik antioksidanlara ihtiyacın azalmasına işaret edebilir. Koksel ve ark. (2006) ratlarda *Salmonella typhimurium* lipopolisakariti (endotoksin) verilerek oluşturulan akut akciğer hasarında azalan serum total antioksidan kapasitesinin KAFE uygulaması ile değişmediğini tespit etmişler ve KAFE'nin serbest radikal oluşumunu engelleyerek antioksidan artışına ihtiyacı azalttığını bildirmişlerdir. Şaşırtıcı olan enfeksiyon yok iken KAFE'nin tek başına ve antibiyotikle kullanıldığında serumda MDA artışına, antioksidan enzimlerde ise değişimlere sebep olmasıdır. Zıt olarak ratlarda deneysel akciğer travmalarının araştırıldığı bir çalışmada KAFE'nin kontrol grubu serum MDA, SOD, CAT değerleri üzerine etkisi tespit edilememiştir (Sırmalı ve ark. 2013).

ORT grubuna KAFE uygulamaları AST ve ALT aktivitesinde azalmalara sebep olmuştur. Bu KAFE'nin antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri (Koksel ve ark. 2006; Wang ve ark. 2013) sonucu doku hasarını azaltıcı etkisiyle ilişkilendirilebilir. Rat sepsis modelinde ve hepatopulmoner sendromda KAFE kullanımının akciğer, karaciğer, renal fonksiyonları düzelttiği, akciğer ve

karaciğer hasarını azalttığı bildirilmiştir (Tekin ve ark. 2008; Tekin ve ark. 2011).

Kanatlılarda bakteriyel solunum yolu hastalığında oksidatif stresi önlemek için KAFE'nin kullanılmasının etkilerini araştıran bu ilk çalışmanın sonuçlarına göre, ORT enfeksiyonunda tek başına KAFE uygulamasının sistemik oksidan-antioksidan denge üzerine olumlu etkileri vardır diyebiliriz.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma, TAGEM tarafından TAGEM/HS/09/12/03/153 nolu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Aebi H (1984).** Catalase in vitro assay methods. *Method Enzymol*, 105, 121-126.
- Altınordu S, Eraslan G (2009).** Effects of some quinolone antibiotics on malondialdehyde levels and catalase activity in chicks. *Food Chem Toxicol*, 47(11), 2821-3.
- Anadón A, Martínez-Larrañaga MR, Díaz MJ, Bringas P, Martínez MA, Fernández-Cruz ML, Fernández MC, Fernández R (1995).** Pharmacokinetics and residues of enrofloxacin in chickens. *Am J Vet Res*, 56(4), 501-506.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M (1966).** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J Clin Pathol*, 45, 493-496.
- Benzer F, Yılmaz S (2009).** Effects on oxidative stress and antioxidant enzyme activities of experimentally induced *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in broilers. *J Anim Vet Adv*, 8 (3), 548-553.
- Calikoglu M, Tamer L, Sucu N, Coskun B, Ercan B, Gul A, Calikoglu I, Kanik A (2003).** The effects of caffeic acid phenethyl ester on tissue damage in lung after hindlimb ischemia-reperfusion. *Pharmacol Res*, 48(4), 397-403.
- Chavan S, Sava L, Saxena V, Pillai S, Sontakke A and Ingole D (2005).** Reduced Glutathione: Importance of specimen collection. *I J of Clin Biochem*, 20 (1), 150-152.
- Dwivedi VK, Soni A, Chaudhary M, Singh CP, Shrivastava SM (2009).** Fixed-dose combination of cefepime plus amikacin (potentox) inhibits pneumonia infection. *Exp Lung Res*. 35 (7), 621-9.
- Fairbanks VF, Klee GG (1986).** Biochemical aspects of hematology. In: Tietz NW (Ed.): Textbook of clinical chemistry. WB Saunders Company, Philadelphia, pp. 1532-1534.
- Fernandes PB (1988).** Mode of action, and in vitro and in vivo activities of the fluoroquinolones. *J Clin Pharmacol*, 28, 156-168.
- Gündoğdu S, Ertekin A (2006).** İnsanlarda üst ve alt solunum yolu enfeksiyonlarının lipit peroksidasyonu, antioksidan savunma sistemleri üzerine etkilerinin araştırılması. *YYÜ Vet Fak Derg*, 17 (1-2), 19-25.
- Gürbay A, Gonthier B, Daveloose D, Favier A, Hincal F (2001).** Microsomal metabolism of ciprofloxacin generates free radicals. *Free Radic Biol Med*, 30 (10), 1118-1121.
- Hermes-Lima M, Storey JM, Storey KB (1998).** Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comp Biochem Physiol. B-Biochem Mol Biol*, 120, 437-448.
- Hinz KH, Blome C, Ryll M (1994).** Acute exudative pneumonia and airsacculitis associated with *Ornithobacterium rhinotracheale* in turkeys. *Vet Record*, 135, 233-234.
- Kayden HJ, Chow CK, Bjornson LK (1973).** Spectrophotometric method for determination of tocopherol in red blood cells. *J Lipid Res*, 14 (5), 533-40.
- Koksel O, Ozdulger A, Tamer L, Cinel L, Ercil M, Degirmenci U, Unlu S, Kanik A (2006).** Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipopolysaccharide-induced lung injury in rats. *Pulm Pharmacol Ther*, 19 (2), 90-5.
- Lamsal M, Gautam N, Bhatta N, Toora BD, Bhattacharya SK, Baral N (2007).** Evaluation of lipid peroxidation product, nitrite and antioxidant levels in newly diagnosed and two months follow-up patients with pulmonary tuberculosis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 38 (4), 695-703.
- Lawrence RA, Burk RF (1976).** Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 71 (4), 952-958.

- Liu B, Cui Y, Brown PB, Ge X, Xie J, Xu P (2015).** Cytotoxic effects and apoptosis induction of enrofloxacin in hepatic cell line of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Fish Shellfish Immunol*, 47 (2), 639-44.
- Lyall F, Young A, Greer IA (1995).** Nitric oxide concentrations are increased in the fetoplacental circulation in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 173 (3), 714-718.
- Ma Y, Zhang JX, Liu YN, Ge A, Gu H, Zha WJ, Zeng XN, Huang M (2016).** Caffeic acid phenethyl ester alleviates asthma by regulating the airway microenvironment via the ROS-responsive MAPK/Akt pathway. *Free Radic Biol Med*, 101, 163-175.
- Ozyurt H, Söğüt S, Yildirim Z, Kart L, Iraz M, Armutçu F, Temel I, Ozen S, Uzun A, Akyol O (2004).** Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on bleomycine-induced lung fibrosis in rats. *Clin Chim Acta*, 339 (1-2), 65-75.
- Palanisamy GS, Kirk NM, Ackart DF, Shanley CA, Orme IM, Basaraba RJ (2011).** Evidence for oxidative stress and defective antioxidant response in guinea pigs with tuberculosis. *PLoS One*, 6 (10), e26254.
- Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC (1966).** Estimation of product of lipid peroxidation (malonyldialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem*, 16 (2), 359-364.
- Reitman S, Frankel S (1957).** A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol*, 28, 56-6.
- Restori KH, McDaniel KL, Wray AE, Cantorna MT, Ross AC (2014).** *Streptococcus pneumoniae*-induced pneumonia and *Citrobacter rodentium*-induced gut infection differentially alter vitamin A concentrations in the lung and liver of mice. *J Nutr*, 144 (3), 392-8.
- Rizzo A, Pantaleo M, Mutinati M, Trisolini C, Minoia G, Spedicato M, Roscino MT, Punzi S, Pampurini F, Jirillo F, Sciorsci RL (2009).** Effects of antibiotics on biochemical parameters, leukocytes and reactive oxygen species (ROS) in bitches after ovariectomy. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 31(4), 682-687.
- Semba RD (1994).** Vitamin A, immunity and infection. *Clin Infect Dis*, 19,489-99.
- Sirmali M, Solak O, Tezel C, Sirmali R, Ginis Z, Atik D, Agackıran Y, Koylu H, Delibas N (2013).** Comparative analysis of the protective effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on pulmonary contusion lung oxidative stress and serum copper and zinc levels in experimental rat model. *Biol Trace Elem Res*, 151(1), 50-58.
- Sprenger SJ, Back A, Shaw DP, Nagaraja KV, Roepke DC, Halvorson DA (1998).** *O. rhinotracheale* infection in turkeys: experimental reproduction of the disease. *Avian Dis*, 42, 154-161.
- Sun Y, Oberley WL, Li Y (1988).** A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*, 34, 497-500.
- Suntres ZE, Omri A, Shek PN (2002).** *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury: role of oxidative stress. *Microb Pathog*, 32 (1), 27-34.
- Suzuki JP, Katoh NA (1990).** A simple and cheap method for measuring serum vitamin A in cattle using only spectrophotometer. *Jpn J Vet Sci*, 52 (6), 1282-1284.
- Tekin A, Küçükkartallar T, Türkyılmaz S, Dinçkan A, Esen H, Ateş B, Yılmaz H, Kartal A (2008).** Effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on sepsis in rats. *Inflammation*, 31 (4), 273-80.
- Tekin A, Türkyılmaz S, Küçükkartallar T, Cakır M, Yılmaz H, Esen H, Ateş B, Ciftci I, Kartal A (2011).** Effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on hepatopulmonary syndrome. *Inflammation*, 34 (6), 614-9.
- Thieme S, Mühldorfer K, Lüschoff D, Hafez HM (2016).** Molecular characterization of the recently emerged poultry pathogen *Ornithobacterium rhinotracheale* by Multilocus Sequence Typing. *PLoS One*, 11 (2), e0148158.
- Unal M, Ozturk C, Aslan G, Aydin Ö, Görür K (2002).** The effect of high single dose parenteral vitamin A in addition to antibiotic therapy on healing of maxillary sinusitis in experimental acute sinusitis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 65,219-23.
- Van Empel PCM, Hafez HM (1999).** *Ornithobacterium rhinotracheale*: A review. *Avian Pathol*, 28, 217-227.
- Van Veen L, Van Empel P, Fabri T (2000).** *O. rhinotracheale*, A primary pathogen in broilers. *Avian Dis*, 44, 896-900.
- Wang P, Ye XL, Liu R, Chen HL, Liang X, Li WL, Zhang XD, Qin XJ, Bai H, Zhang W, Wang X, Hai CX (2013).** Mechanism of acute lung injury due to phosgene exposition and its protection by caffeic acid phenethyl ester in the rat. *Exp Toxicol Pathol*, 65 (3), 311-8.
- Yazar E, Er A, Uney K, Bulbul A, Avci GE, Elmas M, Tras B (2010).** Effects of drugs used in endotoxic shock on oxidative stress and organ damage markers. *Free Radic Res*, 44 (4), 397-402.
- Yıldız OG, Soyuer S, Saraymen R, Eroglu C (2008).** Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on radiation induced lung injury in rats. *Clin Invest Med*, 31 (5), E242-7.