

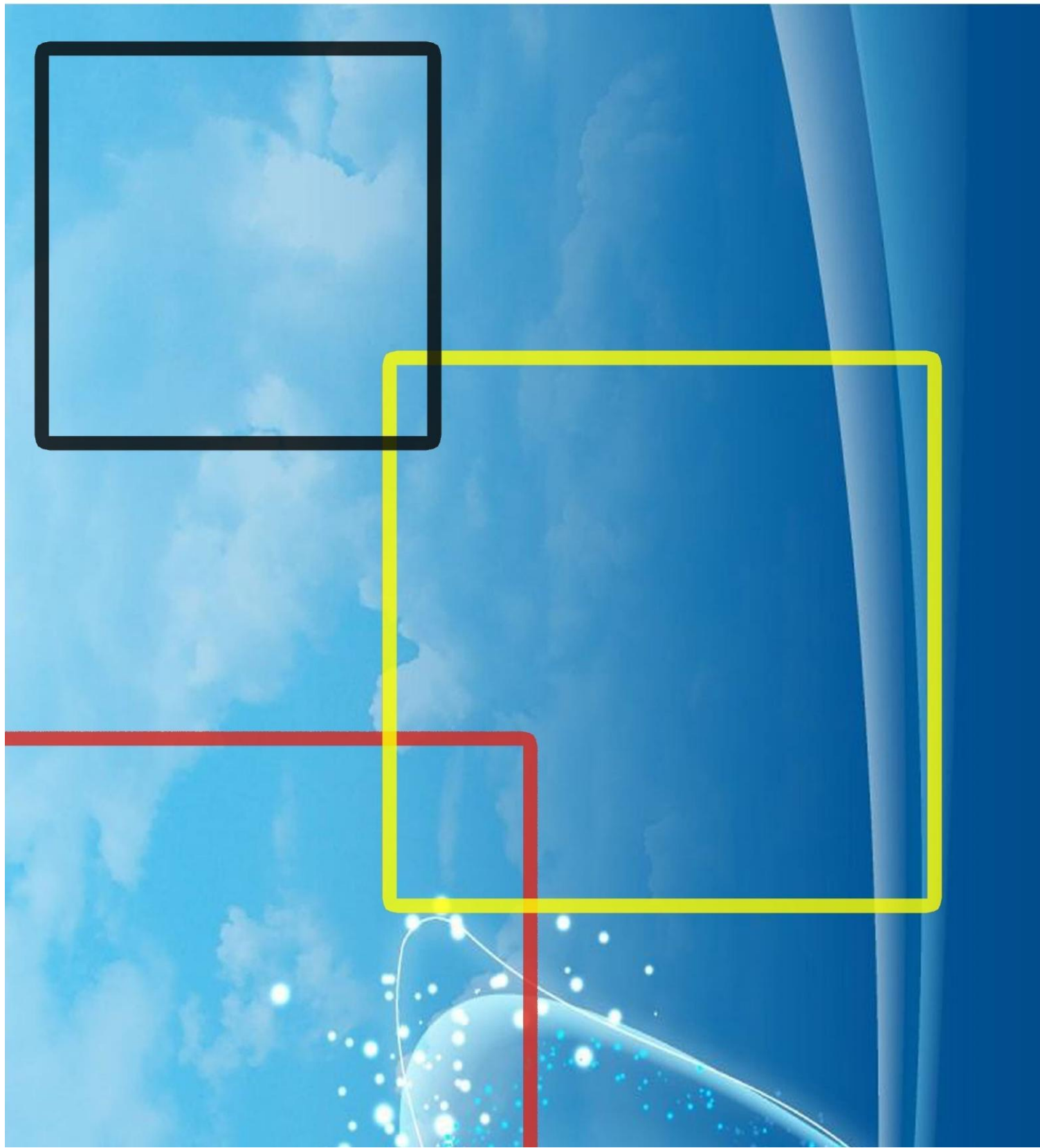


VAN VETERINARY JOURNAL

Year: 2026 / Volume: 37 / Issue: 2

ISSN : 2149-3359

e-ISSN : 2149-8644





July - 2026



VAN VETERINARY JOURNAL

This journal previously published as: **Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**

ISSN: 2149-3359

E-ISSN: 2149-8644

Owner

Prof. Dr. Mecit YÖRÜK (Dean)

Editor-in Chief

Prof. Dr. Cumali ÖZKAN

Van YÜU, Faculty of Veterinary, Journal Editorial, 65040 - Campus / Van - Türkiye

Tel: +90 (432) 225 10 28 Fax: +90 (432) 225 11 27 e-mail: vfd@yyu.edu.tr

Editors (Editorial Board)

Assist. Prof. Dr. Caner KAYIKCI (Co-Editor)	Assist. Prof. Dr. Ahmet Fatih DEMİREL (Electronic Journal Editor)
Assoc. Prof. Dr. Osman YILMAZ (Co-Editor)	Assist. Prof. Dr. Halil Cumhur YILMAZ (Electronic Journal Editor)
Assoc. Prof. Dr. Nebi ÇETİN (Technical Editor)	Prof. Dr. Bekir OĞUZ (Proof Quality Editor)
Assoc. Prof. Dr. Davut KOCA (Technical Editor)	Assoc. Prof. Dr. Kadir AKAR (Proof Quality Editor)
Assist. Prof. Dr. Ömer GEZGİNÇ (Technical Editor)	Prof. Dr. Leyla MİS (Section Editor)
Res. Asst. Seda KESKİN (Technical Editor)	Prof. Dr. Abdullah KARASU (Section Editor)
Prof. Dr. Gamze ÇAKMAK (Language Editor)	Prof. Dr. Turan YAMAN (Section Editor)
Assist. Prof. Dr. Mustafa ÖZBEK (Language Editor)	Assist. Prof. Dr. Tuncer ÇAKMAK (Section Editor)
Assoc. Prof. Dr. Sadi ELASAN (Statistical Editor)	Assist. Prof. Dr. Çağrı KALE (Section Editor)
Assist. Prof. Dr. Veyisel DELİBAŞ (Electronic Journal Editor)	

Publication Board

Dr. Ahmet Cihat ÖNER (Van Yuzuncu Yil University)	Dr. Memiş BOLACALI (Kirsehir Ahi Evran University)
Dr. Akın KIRBAŞ (Atatürk University)	Dr. Murat GÜZEL (Ondokuz Mayıs University)
Dr. Ali Evren HAYDARDEDEOĞLU (Aksaray University)	Dr. Orhan YILMAZ (Van Yuzuncu Yil University)
Dr. Askarbek TULEBAEV (Kyrgyz-Turkish Manas University)	Dr. Reşit ALDEMİR (Van Yüzüncü Yıl University)
Dr. Aynur ŞİMŞEK (Dicle University)	Dr. Sema USLU (Sivas Cumhuriyet University)
Dr. Bahattin ÇAK (Van Yuzuncu Yil University)	Dr. Serkan YILDIRIM (Kyrgyz-Turkish Manas University)
Dr. Bengi ÇINAR KUL (Ankara University)	Dr. Ulaş ACARÖZ (Afyon Kocatepe University)
Dr. Mehmet Fatih BOZKURT (Afyon Kocatepe University)	Dr. Volkan KOŞAL (Van Yuzuncu Yil University)

Advisory Board

Dr. Alev Gürol BAYRAKTAROĞLU (Ankara University)	Dr. Suphi DENİZ (Van Yuzuncu Yil University)
Dr. Cenk YARDIMCI (Ondokuz Mayıs University)	Dr. Taylan AKSU (Van Yuzuncu Yil University)
Dr. Durmuş Alpaslan KAYA (Hatay Mustafa Kemal University)	Dr. Turan CİVELEK (Afyon Kocatepe University)
Dr. Füsün TEMAMOĞLU (Harran University)	Dr. Yakup Can SANCAK (Van Yuzuncu Yil University)
Dr. Saadet BELHAN (Van Yuzuncu Yil University)	Dr. Yılmaz ARAL (Ankara University)

This journal is published three times a year. Journal Tittle Abbreviation: **Van Vet J**
All articles in this journal are available free of charge from <https://dergipark.org.tr/tr/pub/vanvetj>

Year	Volume	Issue
2026	37	2

This journal indexed / abstracted in Asos Index, CAB Abstracts, EBSCOhost, Google Scholar, Index Copernicus, Sobiad, TR Dizin and Türkiye Atıf Dizini



July - 2026



VAN VETERINARY JOURNAL

This journal previously published as: **Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**

ISSN: 2149-3359

E-ISSN: 2149-8644

Reviewers of This Issue

Prof. Dr. Aylin KASIMOĞLU (Kırıkkale University)	Assoc. Prof. Dr. Mustafa ESER (Anadolu University)
Prof. Dr. Ferhan KAYGISIZ (İstanbul University-Cerrahpaşa)	Assoc. Prof. Dr. Ömer AYDIN (Atatürk University)
Prof. Dr. İbrahim AYDIN (Selçuk University)	Assoc. Prof. Dr. Ömer Faruk KELEŞ (Van Yuzuncu Yıl University)
Prof. Dr. Kutlay GÜRBULAK (Erciyes University)	Assoc. Prof. Dr. Özlem AYDIN BERKTAŞ (Giresun University)
Prof. Dr. Mikail ARSLAN (Bandırma Onyedil Eylül University)	Assoc. Prof. Dr. Sedat ÇETİN (Ankara Yıldırım Beyazıt University)
Prof. Dr. Miyase ÇINAR (Kırıkkale University)	Assoc. Prof. Dr. Serkan Ali AKARSU (Atatürk University)
Prof. Dr. Necati TİMURKAAN (Fırat University)	Assoc. Prof. Dr. Seyda ŞAHİN (Sivas Cumhuriyet University)
Prof. Dr. Tahir BAYRIL (Dicle University)	Assist. Prof. Dr. Bünyamin İREHAN (Harran University)
Prof. Dr. Tülay BÜYÜKOĞLU (Burdur Mehmet Akif Ersoy University)	Assist. Prof. Dr. Cemil ŞAHİNER (Aydın Adnan Menderes University)
Assoc. Prof. Dr. Ahmet Ufuk KÖMÜROĞLU (Van Yuzuncu Yıl University)	Assist. Prof. Dr. Fadime ATALAY DURLU (Kafkas University)
Assoc. Prof. Dr. Alper BARAN (Atatürk University)	Assist. Prof. Dr. Gökhan UYANIK (Hatay Mustafa Kemal University)
Assoc. Prof. Dr. Arda Selin TUNÇ (Ankara University)	Assist. Prof. Dr. Gözde ŞAHİNGÖZ DEMİRPOLAT (Yozgat Bozok University)
Assoc. Prof. Dr. Cevat SİPAHİ (Burdur Mehmet Akif Ersoy University)	Assist. Prof. Dr. Gupse Kübra KARADEMİR (Dokuz Eylül University)
Assoc. Prof. Dr. Devran COŞKUN (Siirt University)	Assist. Prof. Dr. Muhammet Hanifi SELVİ (Necmettin Erbakan University)
Assoc. Prof. Dr. Fatma SATILMIŞ (Selçuk University)	Assist. Prof. Dr. Nilgün AYDIN (Kafkas University)
Assoc. Prof. Dr. Hasan ALKAN (Selçuk University)	Assist. Prof. Dr. Serol KORKMAZ (Çukurova University)
Assoc. Prof. Dr. Meltem SAĞIROĞLU (Fırat University)	Assist. Prof. Dr. Ülkü YEREBASAN (Bingöl University)
Assoc. Prof. Dr. Mustafa CELLAT (Hatay Mustafa Kemal University)	

This journal is published three times a year. Journal Title Abbreviation: Van Vet J

All articles in this journal are available free of charge from <https://dergipark.org.tr/tr/pub/vanveti>

Year	Volume	Issue
2026	37	2

This journal indexed / abstracted in Asos Index, CAB Abstracts, EBSCOhost, Google Scholar, Index Copernicus, Sobiad, TR Dizin and Türkiye Atf Dizini

Original Articles

- **Girişgin O, Karaman D, Girişgin AO, Kürkçüoğlu M.** *Origanum vulgare* Essential Oil Demonstrates *In Vivo* and *In Silico* Activity Against a Mouse Nematode *Syphacia obvelata* (Rudolphi, 1802) (*Origanum vulgare* Esansiyel Yağının Fare Nematodu *Syphacia obvelata*'ya (Rudolphi, 1802) Karşı İn-Vivo ve İn-Siliko Etkisi) **132-139**
- **Sengul SA.** Tin (Sn) Levels in Cow's Bulk Tank Milk and Dietary Risk Assessment from Dairy Farms in Industrial and Non-industrial Areas of Hatay Province (Hatay İlinde Endüstriyel ve Endüstriyel Olmayan Bölgelerdeki Süt Çiftliklerinden Toplanan İneklerin Tank Sütünde Kalay (Sn) Düzeyleri ve Diyet Risk Değerlendirmesi) **140-144**
- **Afşar M, Yasul M, Elasan S, Yılmaz H.** Research Trends and Scientific Progress in *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) Studies (*Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) Çalışmalarında Araştırma Eğilimleri ve Bilimsel Gelişmeler) **145-151**
- **Tebrizi B, Karacan Sever N, Ekinci E, Yeşilmen Alp S, Özkaraca M.** Evaluation of Immunohistochemical Expression of Collagen Type I and IV, Histopathological Changes, and Bacterial Isolates in Canine Pyometra (Köpek Pyometrasında Kollajen Tip I ve IV'ün İmmünohistokimyasal Ekspresyonu, Histopatolojik Değişiklikler ve Bakteriye İzolatların Değerlendirilmesi) **152-159**
- **Batı YU, Sezer M, Makav M et al.** Assessment of Serum Malondialdehyde (MDA), Reduced Glutathione (GSH) and Thiol-Disulfide Homeostasis in Neonatal Calves Diagnosed with Cryptosporidiosis (Kriptosporidiyozlu Neonatal Buzagılarda Serum Malondialdehit, Redükte Glutasyon ve Tiyol Disülfid Homeostazının Değerlendirilmesi) **160-165**
- **Denk H, Yılmaz O.** Karakaş Koyunlarında Meme Morfolojisinin Süt Verimine, Sütün Fiziksel Özellikleri ve Kimyasal Bileşenlerine Etkisi (The Effect of Udder Morphology on Milk Yield, Physical Traits and Chemical Components of Milk in Karakaş Sheep) **166-171**
- **Belhan S, Özdek U.** Investigation of the Effects of *Diplotaenia turcica* Root Extract on Sperm Parameters and Antioxidant Markers in Methotrexate-Administered Rats (Metotreksat Uygulanan Sıçanlarda *Diplotaenia turcica* Kök Ekstraktının Sperm Parametreleri ve Antioksidan Parametreler Üzerindeki Etkisinin Araştırılması) **172-176**
- **Bozkurt İ, Alat Ö, Karaarslan T, Aktaş Şenocak E, Halıcı MB.** Sıçanlarda Lambda-Sihalo-trin Kaynaklı Gastrointestinal Hasar Üzerine Karvakrol'ün Etkilerinin İncelenmesi: "Apoptoz ve Endoplazmik Retikulum Stresi Yolaklarının Düzenlenmesi" (Investigation of the Effects of Carvacrol on Lambda-Cyhalothrin-Induced Gastrointestinal Injury in Rats: "Modulation of Apoptosis and Endoplasmic Reticulum Stress Pathways") **177-184**

Original Articles

- **Karadal F, Sakin Şahin T, Bağcı C, Ertuş Onmaz N (2026).** Geleneksel El Yapımı Niğde Basma Bidon Tulum Peynirlerinin Karakterizasyonu: Üretim Değişkenlerinin Mikrobiyal Ekosistem Üzerindeki Etkisi (Characterization of Artisanal Niğde Basma Bidon Tulum Cheeses: Impact of Processing Variables on Microbial Ecosystems) **185-193**
- **Çakmak Ö, Acaröz U, Arslan-Acaröz D et al. (2026).** Determination of Fumonisin Levels in Flour and Tarhana Samples from Different Provinces of Türkiye (Türkiye'nin Farklı İllerinden Alınan Un ve Tarhana Örneklerinde Fumonisin Düzeylerinin Belirlenmesi) **194-200**
- **Öner AC, Akarsu Oruç E (2026).** Antinociceptive and Anti-inflammatory Efficacy of Oleic and Linoleic Acid Application (Oleik ve Linoleik Asit Uygulamasının Antinosiseptif ve Antiinflamatuvar Etkinliği) **201-206**
- **Kara U, Baki Acar D, Düzer M, Hızlı H (2026).** The Effect of Second Prostaglandin F2α Application with the Presynchronization Protocol on Fertility in Simmental Cows (Simental İneklerde Presenkronizasyon Protokolünde İkinci Prostaglandin F2α Uygulamasının Fertiliteye Etkisi) **207-212**
- **Özdemir HH, Günlü A (2026).** Konya İli Kadınhanı ve Sarayönü İlçelerinde Seçilmiş Bazı Hayvan Hastalıklarının Ekonomik Önemi Üzerine Araştırma (Research on the Economic Importance of Selected Animal Diseases in Kadınhanı and Sarayönü Districts of Konya Province) **213-219**
- **Arslan Acaröz D (2026).** Endemik Sideritis galatica (Lamiaceae) Toprak Üstü Kısımlarının Fenolik İçeriği ve in vitro Antioksidan Aktivitesine Çözücülerin Karşılaştırmalı Etkisi (A Comparative Evaluation of Solvent Effects on the Phenolic Content and in vitro Antioxidant Activity of Aerial Parts of Endemic Sideritis galatica (Lamiaceae)) **220-226**

Review

- **Paksoy Y, Arslan D (2026).** Perissodactyla (Tek Toynaklılar) Takımının Evrimi, Morfolojisi ve Ekolojisi (The Evolution, Morphology, and Ecology of The Perissodactyla (Single-Toed Ungulates)) **227-235**

Corrigendum

- **Değer Uluğbey Z, Katanalp ÖF, Güneş A, Ocak M, İçen H.** Mardin Yöresindeki Rahvan Atlarda Hematolojik Parametrelerin Referans Aralıklarının Belirlenmesi (Determination of Reference Intervals of Haematological Parameters in Rahvan Horses of the Mardin Region) **236-236**



Origanum vulgare Essential Oil Demonstrates *In Vivo* and *In Silico* Activity Against a Mouse Nematode *Syphacia obvelata* (Rudolphi, 1802)

Oya GİRİŞGİN¹  Dilara KARAMAN²  Ahmet Onur GİRİŞGİN^{3,*}  Mine KÜRKÇÜOĞLU⁴ 

¹ Bursa Uludağ University, Karacabey Vocational School, Department of Veterinary, 16700, Bursa, Türkiye

² Yıldız Technical University, Faculty of Chemistry and Metallurgy, Department of Bioengineering, 34349, İstanbul, Türkiye

³ Bursa Uludağ University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Parasitology, 16059, Bursa, Türkiye

⁴ Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, 26470, Eskişehir, Türkiye

Received: 28.10.2025

Accepted: 06.07.2026

ABSTRACT

Oxyurid nematode infections are common in animals and often recurrent, necessitating the development of new anthelmintic agents. *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* essential oil (OEO) was evaluated for its nematocidal effects against the *Syphacia obvelata* nematode in naturally infected mice. Mice received oral OEO at 300 and 600 mg/kg doses, with egg counts monitored via the perianal tape method. Gas chromatography identified carvacrol (84.0%) as the dominant compound, while *in silico* docking revealed β -caryophyllene exhibited strong binding affinities to β -tubulin and carnitine palmitoyltransferase 2, key nematode drug targets. OEO treatment significantly reduced parasite egg counts by up to 98% at 7 days post-treatment, with sustained effects at 14 days. These findings suggest that OEO, particularly β -caryophyllene, possesses promising anthelmintic activity against oxyurid nematodes, as a preliminary study. Further studies are warranted to explore its therapeutic potential and mechanisms of action.

Keywords: Anthelmintic properties, Essential oils, Molecular docking, Nematocidal activity, *Origanum vulgare*.

ÖZ

Origanum vulgare Esansiyel Yağının Fare Nematodu *Syphacia obvelata*'ya (Rudolphi, 1802) Karşı *In-Vivo* ve *In-Siliko* Etkisi

Oksyurid nematod enfeksiyonları hayvanlarda yaygındır ve sıklıkla tekrarlar. Bu nedenle yeni anthelmintik ajanların geliştirilmesi gerekmektedir. *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* uçucu yağı (OEO), *Syphacia obvelata* nematodu ile doğal enfekte farelerde, nematosidal etkiler açısından değerlendirilmiştir. Farelere 300 ve 600 mg/kg dozlarında oral OEO verilmiş ve yumurta sayıları perianal bant yöntemi ile izlenmiştir. Gaz kromatografisi, karvakrolü (%84.0) baskın bileşik olarak tanımlarken, *in-siliko* yerleştirme, β -karyofilinin β -tubulin ve karnitin palmitoil transferaz 2'ye, yani nematod ilaçlarının temel hedeflerine güçlü bağlanma eğilimi gösterdiğini ortaya koymuştur. OEO tedavisi, tedaviden sonraki 7. günde parazit yumurta sayısını %98'e kadar önemli ölçüde azaltmış ve etkilerin 14. günde devam etmesini sağlamıştır. Bu bulgular, OEO'nun, özellikle β -karyofilinin, oksyurid nematodlara karşı umut verici bir anthelmintik aktiviteye sahip olduğunu bir ön çalışma olarak göstermektedir. Terapötik potansiyelini ve etki mekanizmalarını araştırmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Anthelmintik özellik, Esansiyel yağ, Moleküler yerleştirme, Nematosidal aktivite, *Origanum vulgare*.

INTRODUCTION

Oxyurid infections in domestic animals are significant due to their impact on animal health and welfare, as well as potential implications for zoonotic transmission. Oxyurid nematodes primarily affect various domestic animals, including rodents, reptiles, and some mammals, leading to a spectrum of health issues ranging from asymptomatic infections to severe clinical manifestations (Taylor et al. 2016). Despite numerous studies (Santoro et al. 2007; Castro et al. 2013; Pensel et al. 2014) investigating the anthelmintic properties of plant extracts, the number of *in*

silico studies examining the action mechanism of active compounds remains insufficient. However, *in silico* studies provide fast and reliable results for this type of investigation when compared with classical application methods.

Benzimidazoles inhibit microtubule formation by binding β -tubulin in nematodes (Lacey 1990; Martin et al. 2014). Anthelmintic drugs have been used for an extended period due to their broad spectrum, good tolerability, and low price (Lanusse et al. 2014). Excessive and unnecessary use of this type of drug leads to the emergence of resistant



nematode populations (dos Santos et al. 2014). Albendazole's common adverse effects are abdominal pain, nausea, vomiting, dizziness, temporary hair loss, headache, and fever (Jung and Gonzales-Esquivel 2002). Therefore, further research is required to determine whether plant extracts and essential oils will be applied to infected animals in order to discover new drugs that can be used safely.

Origanum vulgare L. subsp. *hirtum* is a shrubby species in the Lamiaceae family, found in Mediterranean and Asian regions (Ietswaart 1982; Celep and Dirmenci 2017). It has 12 pairs of twigs per stem, with leaves that are petiolate or sessile, measuring 6-40×5-30 mm. The spicules measure 3-30×2-8 mm, and the corolla is purple, pink, or white, measuring 3-10 mm (Ietswaart 1982). The essential oil has antiparasitic activity due to its thymol and carvacrol compounds (Santoro et al. 2007). In a comparative study, *Origanum vulgare* L. essential oil demonstrated potential anticancer activity against hepatocellular carcinoma (Hep3B), human breast adenocarcinoma (MCF-7), and human lung carcinoma (A549) cell lines. Antiproliferative activity of essential oil was found to be significant on these cell lines as compared to standards (cisplatin and 5-fluorouracil) (Erenler et al. 2023).

Origanum essential oil contains several monoterpenes and sesquiterpenes, including β -caryophyllene. Although β -caryophyllene is a sesquiterpene found widely in nature, its anthelmintic properties have never been investigated before. The investigation of β -caryophyllene, a compound found in plants such as *Cannabis sativa*, *Cinnamomum verum*, and *Syzygium aromaticum* (Ludwiczuk et al. 2017), which can be cultivated in Asian and African countries where helminthic infections are prevalent, may contribute to the discovery of promising natural anthelmintic components needed in these regions.

Enzymes in the carnitine palmitoyl transferase (CPT) family (EC 2.3.1.21) transport long-chain fatty acids from the cytoplasm to the mitochondria, which can be oxidised to release energy (Taylor et al. 2013). A drug called Perhexiline has been reported to target CPT homolog enzymes in humans. Inhibition of CPT 2 is effective against *Caenorhabditis elegans* larvae, a harmful parasitic nematode *Haemonchus contortus*, and the filarial nematode *Onchocerca linealis* (Ceccarelli et al. 2011). Therefore, CPT 2 has been considered a significant antinematodal drug target (Tyagi et al. 2018).

In domestic rodents, oxyurid infections, especially by species like *Syphacia* and *Aspicularis*, have been noted to cause a range of health problems despite often being regarded as relatively benign under low infestation levels. *Syphacia obvelata* (Rudolphi 1802) is a common oxyurid nematode of mice and is characterized by its distinct morphology, including a tapered tail and a prominent cephalic structure. This nematode is often found in the intestines of its hosts, where it can cause various gastrointestinal issues (Pisanu et al. 2003).

In this study, we aimed to assess the anthelmintic efficacy of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* essential oil (OEO) on mice naturally infected with the oxyurid nematode *Syphacia obvelata* (Rudolphi 1802). We analyzed the bioactive components in OEO and evaluated how these components bind to antinematodal drug target proteins. This research is necessary to identify natural alternatives that can effectively combat drug resistance in animal parasites, thereby improving treatment options and reducing reliance on synthetic medications.

MATERIAL AND METHODS

Ethics Committee Approval

This study was conducted with the permission of Bursa Uludağ University, Animal Experiments Local Ethics Committee on 11.07.2017 with the number 2017-10/07.

Preparation of Origanum Essential Oil

Origanum shoots were cultivated in Eskişehir obtained from the Atatürk Horticultural Central Research Institute, Yalova, Türkiye. Aerial parts of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* were collected on 26 July 2017 from Eskişehir.

A hydrodistillation method was used to extract fresh oregano essential oil from the aerial parts of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, following the procedure outlined in the European Pharmacopoeia (2025). The oil was then stored at 4 °C in a refrigerator until use.

Gas Chromatography (GC) and Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC/MS) Analysis

An Agilent 6890N GC system was used for the GC analysis. The system was equipped with an FID detector set at a temperature of 300 °C. A duplicate column was used for simultaneous auto-injection under the same conditions to ensure the same elution order with GC-MS. The FID chromatogram displayed the relative percentage amounts of the separated compounds.

Table 1: Composition of the essential oil of *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*.

RRI	Compounds	%	Identification Method
1032	a-Pinene	0.5	tr, MS
1035	a -Thujene	0.6	MS
1076	Camphene	0.2	tr, MS
1118	b-Pinene	0.1	tr, MS
1132	Sabinene	0.1	tr, MS
1174	Myrcene	0.9	tr, MS
1176	a -Phellandrene	0.1	tr, MS
1188	a-Terpinene	0.8	tr, MS
1203	Limonene	0.1	tr, MS
1213	b -Phellandrene	0.1	tr, MS
1255	g-Terpinene	3.5	tr, MS
1280	p-Cymene	4.6	tr, MS
1290	Terpinolene	0.1	tr, MS
1452	1-Octen-3-ol	0.1	tr, MS
1474	trans-Sabinene hydrate	0.3	tr, MS
1553	Linalool	tr	tr, MS
1556	cis-Sabinene hydrate	0.1	tr, MS
1611	Terpinen-4-ol	0.6	tr, MS
1612	b-Caryophyllene	1.4	tr, MS
1687	a-Humulene	0.1	tr, MS
1706	a-Terpineol	0.2	tr, MS
1719	Borneol	0.5	tr, MS
1737	b-Bisabolene	0.4	tr, MS
1757	Carvone	0.1	tr, MS
2008	Caryophyllene oxide	0.2	tr, MS
2181	Isothymol	tr	MS
2198	Thymol	0.3	tr, MS
2228	Isocarvacrol	tr	tr, MS
2239	Carvacrol	84.0	tr, MS

RRI: Relative retention indices experimentally calculated against *n*-alkanes; % calculated from FID data; **tr:** Trace (<0.1 %); **tr:** Identification based on comparison with co-injected with standards on an HP Innnowax column; **MS:** identified based on computer matching of the mass spectra with those of the in-house Baser Library of Essential Oil Constituents, Adams, MassFinder and Wiley libraries.

The oregano essential oil was analysed using an Agilent GC-MSD system from Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, CA) with capillary GC/MS. Compounds were separated using an HP-Innowax FSC column from Hewlett-Packard (U.S.A.). The column had a length of 60 meters, an inner diameter of 0.25 millimetres, and a film thickness of 0.25 micrometres. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 0.8 millilitres per minute. The GC oven temperature was initially set to 60 °C and maintained for 10 minutes, then increased to 220 °C at a rate of 4 °C per minute and held there for 10 minutes. Finally, the temperature was raised to 240 °C at 1°C per minute. The split flow was adjusted to 40 millilitres per minute with a split ratio of 40:1, and the injector temperature was set at 250 °C. Mass spectra were taken at 70 eV with a mass range of m/z 35-450.

To identify the oregano essential oil compounds, their mass spectra were compared with those in the Baser Library of Essential Oil Constituents, Wiley GC/MS Library (McLafferty and Stauffer 1989), Adams Library (Adams 2007), and Mass Finder Library (Hochmut 2008). The analysis involved comparing the retention indices of the samples. To calculate the relative retention indices (RRI), a homologous series of n-alkanes was used as reference points. The FID chromatograms were used to calculate the relative percentages of the compounds that were separated. The GC/MS analysis results were presented as the mean percentage in Table 1.

In vivo Procedures

Balb/c mice of both sexes, weighing between 28 and 41 grams, of different ages, were obtained from the Experimental Animals Breeding Centre of Bursa Uludag University in Bursa, Türkiye. These mice were imported from the Netherlands and were not transgenic. They were housed in plastic cages at room temperature (20-24 °C) with a 12-hour light/dark cycle and 55% relative humidity. The animals were fed *ad libitum* and had continuous access to water. Fresh air was provided daily through the ventilation system.

Experimental animals naturally infected with *Syphacia obvelata* were selected using perianal cellophane tape and Fülleborn fecal flotation methods. Each group consisted of six animals, except for the ABZ drug control group, which included eight animals. In total, 26 mice were involved in this study.

Infected mice were divided into four groups consisting of three treatment groups and one negative control group. These groups were generated according to the observed parasite egg numbers in mice by considering the similar average egg numbers in all groups. All cages were labelled according to the mouse number. Egg numbers were obtained from Fülleborn faecal flotation and perianal tape methods performed on two consecutive days. Group 1 (n=6) and Group 2 (n=6) received 300 mg/kg and 600 mg/kg of *Origanum* Essential Oil (OEO), respectively. Group 3 (n=6) received soybean oil (4 ml) as solvent control, and Group 4 (n=8) received Albendazole 20 mg/kg as drug control by completing the 4 ml total volume with soybean oil. Each mouse was given pellets containing the solutions and kept in separate cages. We observed whether the mice fed on the pellets. Groups 1, 2, and 3 were treated for seven consecutive days, but Group 4 was treated for three days at one-day intervals to see the results of a different drug application. The steps of the *in vivo* experiment are shown in Figure 1.

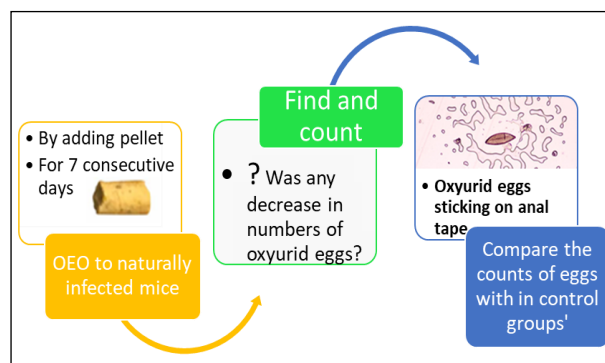


Figure 1: Steps of the *in vivo* experiment.

After the acclimatisation of animals, the perianal tape (cellophane) method was selected to detect the nematode infections. To evaluate the efficacy of the plant extract on egg numbers, the parasite egg count on each mouse's rectum was calculated by counting eggs on anal tape collected from each mouse before the 7th day of treatment and on the 0th, 7th, and 14th days after treatment. To apply this method, approximately 9 × 1 cm cellophane tape was pressed onto the rectum of each mouse 10-15 times. After sticking it to a microscopy slide, *S. obvelata* eggs were counted.

In the perianal band, the reduction percentage of oxyurid eggs was counted as follows (Pagano and Gauvreau 2018):

$$\text{reduction \%} = 100 \times \left(\frac{I - L}{I} \right)$$

I: Initial number of parasite eggs in each group according to the arithmetic mean.

L: Last number of parasite eggs in each group according to the arithmetic mean.

The reduction in the number of parasite eggs across all application groups was compared. The findings were analyzed using the IBM-SPSS statistical software, employing Kruskal-Wallis post hoc analysis (IBM Corporation 2020). Due to the variability in variance caused by the uneven distribution of parasite eggs among the groups, the nonparametric Kruskal-Wallis test was chosen. A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

In silico Molecular Docking

In our study, we selected the most abundant active compounds found in the essential oil of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*. We conducted a docking study with antinematodal drug target proteins to further investigate their potential antinematodal effects. The ten compounds examined in this study include α-thujene, β-caryophyllene, γ-terpinene, borneol, terpinene-4-ol, p-cymene, carvacrol, myrcene, α-pinene, and α-terpinene, all of which were obtained from the PubChem database (Kim et al. 2021). *Haemonchus contortus* β-tubulin (pdb ID: 1OJ0) (Robinson et al. 2004) and *Rattus norvegicus* Carnitine Palmitoyltransferase 2 (CPT 2, pdb ID: 2H4T, resolution: 1.90 Å) (Hsiao et al. 2006) were obtained from the Protein Data Bank (2025). Docking files were created using the ADT program (Huey et al. 2007; Morris et al. 2009). The results were analyzed with the Biovia Discovery Studio Client 2020 software, developed by Dassault Systèmes, Biovia Inc. (2020). The root mean square deviation (RMSD) was calculated using the DockRMSD tool from the Zanglag web server (Bell and Zhang 2019). For the docking simulations involving the β-tubulin protein and the herbal ligands, the coordinates of the original ligand bound to the

protein in the co-crystallized structure were chosen as the center point. The previous docking experiments were useful for predicting the center coordinates of a protein, so we utilized the docking coordinates from the grid box provided by Taylor et al. (2013) for the CPT2 enzyme. In our approach, all protein atoms were considered rigid, while only the hydrogen atoms were allowed to move freely within the protein's active site.

We set the dielectric constant to 10 and established the ionic strength at 0.145. The dimensions of the grid box were defined as 60×60×60, with a grid point spacing of 0.375 Å. The maximum number of generations was set to 27,000, and the maximum number of evaluations was adjusted to 2,500,000, given that the number of rotational bonds was fewer than 10.

For the docking, we chose the AutoDock 4.2 program, employing a Lamarckian genetic algorithm for the procedure (Morris et al. 1998). The docking simulations were conducted with a total of 20 runs. An overview of the process is summarized in Figure 2.

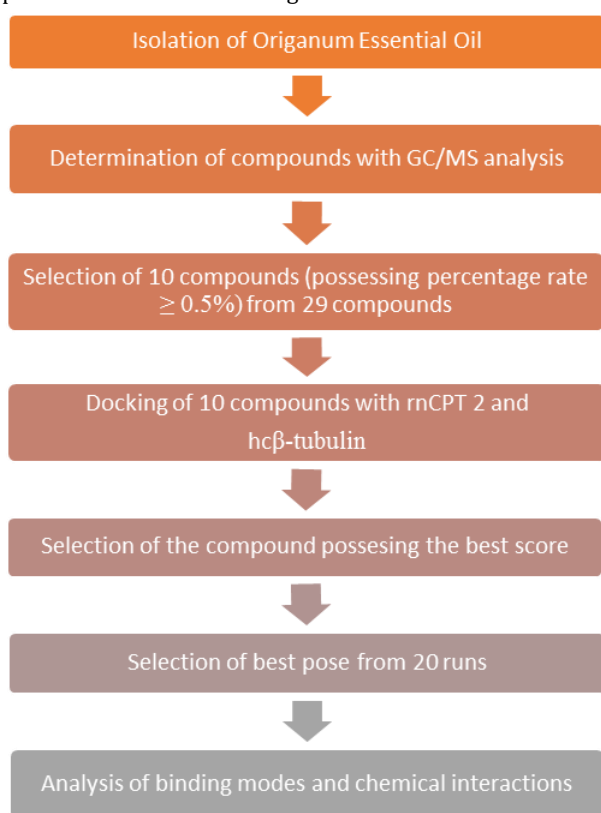


Figure 2: Steps of compound selection and docking.

According to docking simulations of the herbal ligands, the best molecules were estimated via the SwissADME web server (Daina et al. 2017) for ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion) properties. SwissADME web server makes a series of predictions based on chemical formulations and calculations to show the molecule's ability in terms of oral bioavailability, penetration of the blood-brain barrier, and gastrointestinal absorption.

RESULTS

The study demonstrated that *Origanum* essential oil has antinematodal effects against oxyurid nematodes. Additionally, the study searched for interactions between target proteins and bioactive molecules found in the

essential oil to discover new drug scaffolds. This was done using *in silico* methods.

In the chemical analysis of *Origanum* essential oil, carvacrol was identified as the dominant compound, comprising 84.0% of the total content. A total of 29 compounds were identified (Table 1). According to the data presented in Table 1, oxygenated sesquiterpenes account for a larger proportion, while monoterpene hydrocarbons exhibit greater diversity in composition. The high concentration of carvacrol indicates the excellent medicinal quality of *O. vulgare* subsp. *hirtum*, which is grown in Türkiye (Baser 2008).

For the docking test, ten compounds with a presence greater than 0.5% were selected. Among these, four compounds exceeded the 1% threshold: γ-terpinene (3.5%), p-cymene (4.6%), β-caryophyllene (1.4%), and carvacrol (84.0%). In contrast, linalool, isothymol, and isocarvacrol were found in much smaller amounts, each below 0.1%.

The mean number of *S. obvelata* eggs counted by the perianal tape method after applying OEO for seven days is shown in Figure 3. From the 7th day, a significant difference emerged between the group in which soybean oil was given as solvent control and the group in which Albendazole was given as drug control at 20 mg/kg for three days at one-day intervals in the number of parasite eggs.

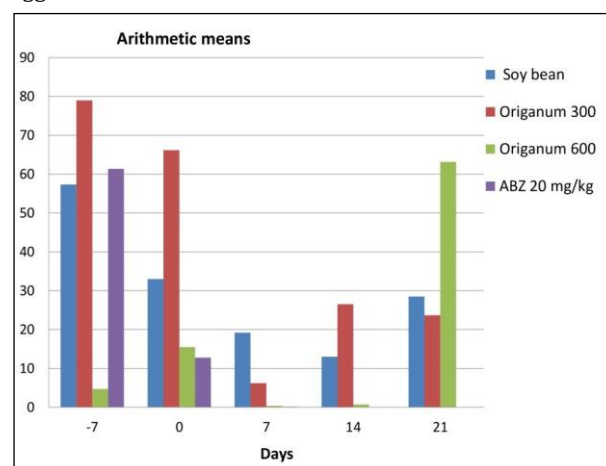


Figure 3: Averages of *S. Obvelata* parasite eggs counted on cellophane in each mouse group.

The study found that the reduction rates of *S. obvelata* eggs on cellophane tapes varied weekly depending on the doses of OEO applied. The most significant difference was observed on the seventh day after the application ended. In the OEO 300 group (Group 1), the reduction percentage was 90.63%, while in the OEO 600 group (Group 2), it reached 98.06% from days 0 to 7 post-application. Additionally, a decrease of 59.96% was noted in the mean number of parasite eggs in the OEO 300 group, and a 95.48% reduction was observed in the OEO 600 group by the 14th day when compared to the pre-treatment count on day 0.

In this study, for the first time, it was observed that administering Oregano Essential Oil (OEO) to laboratory mice infected with *S. obvelata* by adding it to their feed resulted in a reduction in the number of *S. obvelata* eggs. When Albendazole (ABZ) was administered three times at double the usual dose, it was noted that all eggs were eliminated, achieving a 100% cure of the helminthic infection, and there were no adverse effects on the overall health of the mice. However, since the OEO altered the

taste of the feed, the mice did not consume all of the food containing OEO. Consequently, the percentage reduction in the OEO 600 group was lower than anticipated. After treatment, all mice were provided with regular food, ensuring they did not remain hungry for long. This method was preferred because it was more suitable for animal welfare compared to the gavage method.

All groups experienced a significant decrease in the number of eggs by the seventh day of treatment. As expected, the ABZ group showed the most notable reduction, followed by Group 2. By the fourteenth day post-treatment, no eggs were counted in the ABZ group, while Groups 1 and 2 continued to show some infection, albeit with a considerable decrease compared to the initial counts (as shown in Table 2). This suggests that the effects of OEO lasted even after the seven days following treatment.

Table 2: Arithmetic mean of *S. obvelata* eggs counted on perianal tape.

Group	Application	-7. day	0. day	7. day	14. day
1	OEO 300 mg/kg	79	66.2	6.2	26.5
2	OEO 600 mg/kg	4.7	15.5	0.3	0.7
3	Soy oil (4 ml)	57.3	33	19.2	13
4	ABZ 20 mg/kg	61.4	12.8	0.1	0

The results of the Shapiro-Wilk test indicated that the groups did not follow a normal distribution. Additionally, Levene's test revealed that the variances were not homogeneous. Consequently, the Kruskal-Wallis test was conducted. The findings from the Kruskal-Wallis test showed no significant difference between the OEO groups and the solvent control (soy oil) group. However, significant differences were found between the ABZ 20 mg/kg group and both the OEO 300 group and the OEO 600 group. Additionally, a significant difference was noted between the OEO 600 and OEO 300 groups ($p < 0.05$).

Table 3: Docking results of the main bioactive substances in *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* essential oil content.

Compound	K_i	β Tubulin		CPT 2	
		K_i	ΔG (kcal/mol)	K_i	ΔG (kcal/mol)
α -Thujene	13.96 μM		-6.62	34.46 μM	-6.09
β -Caryophyllene	873.99 nM		-8.27	1.19 μM	-8.08
γ -Terpinene	10.31 μM		-6.80	42.97 μM	-5.96
Borneol	15.06 μM		-6.58	9.78 μM	-6.83
Terpinen-4-ol	6.73 μM		-7.06	12.85 μM	-6.67
p -Cymene	37.39 μM		-6.04	134.63 μM	-5.28
Carvacrol	22.48 μM		-6.34	73.84 μM	-5.64
Myrcene	36.21 μM		-6.06	101.54 μM	-5.45
α -Pinene	22.50 μM		-6.34	32.89 μM	-6.12
α -Terpinene	10.30 μM		-6.80	41.19 μM	-5.98

No observable side effects were noted during the application period and two weeks afterward. All mice remained in good condition.

Before docking with the major components in the OEO, β -tubulin was re-docked with Albendazole. The calculated RMSD was found as 1.564 Å using the DockRMSD tool. Based on this value, the accuracy of the docking was evaluated.

According to Table 3, the ΔG values of nine of the ten molecules were found between -5.28 and -6.83 kcal/mol for CPT 2, -6.04 and -7.06 kcal/mol for β -tubulin.

Among these molecules, p -cymene exhibited the lowest binding affinities for CPT 2 and β -tubulin, with K_i values of 134.63 μM and 37.79 μM , respectively. The other eight molecules, aside from β -caryophyllene, displayed binding affinities similar to those of p -cymene. The top three major components identified were carvacrol, p -cymene, and γ -terpinene. Due to their small size, these three monoterpenes are predicted to have limited chemical interactions in inhibiting antinematodal targets. Figure 4 illustrates the structures of these three molecules. In silico calculations indicate that sesquiterpenes, which are larger than monoterpenes, demonstrate improved inhibition results against these target proteins (β -tubulin and CPT 2) and are therefore more promising as potential drug candidates.

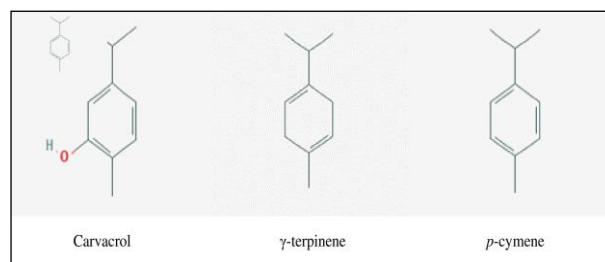


Figure 4: 2D structure of three major compounds in OEO. The docking simulation results indicated that β -caryophyllene exhibited the highest binding affinity for both the CPT 2 enzyme and β -tubulin among the ten molecules isolated from the essential oil of oregano (OEO). The ΔG and K_i values were -8.08 kcal/mol and 1.19 μM for CPT 2, and -8.27 kcal/mol and 873.99 nM for β -tubulin, respectively.

It was found that β -caryophyllene was surrounded by four apolar residues (ALA615, ALA613, LEU592, and VAL597) in the active site of the CPT 2 enzyme and formed electrostatic interactions with these residues (Figure 5 (a) and (b)).

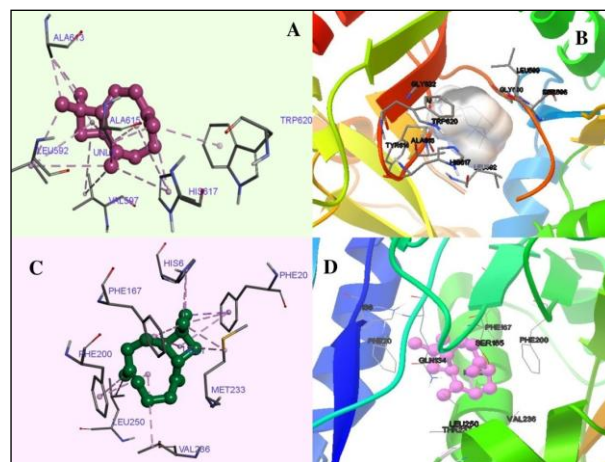


Figure 5: (a) β -caryophyllene and CPT 2 enzyme interactions 3D representation, (b) Secondary structure of CPT 2 with rainbow colour. β -caryophyllene in the surface area and surrounding with interacting residues of the CPT 2 enzyme. (c) β -caryophyllene and β -tubulin interactions 3D representation, (d) Secondary structure of β -tubulin's binding site. Pink balls and sticks represent β -caryophyllene.

The nine-membered cyclo-structure of β -caryophyllene effectively facilitated aromatic interactions with HIS617

and TRP620. Additionally, the following residues formed van der Waals interactions with the compound: SER590, GLY600, TYR614, CYS623, LEU599, GLY622, and SER598, as illustrated in Figure 6 (a).

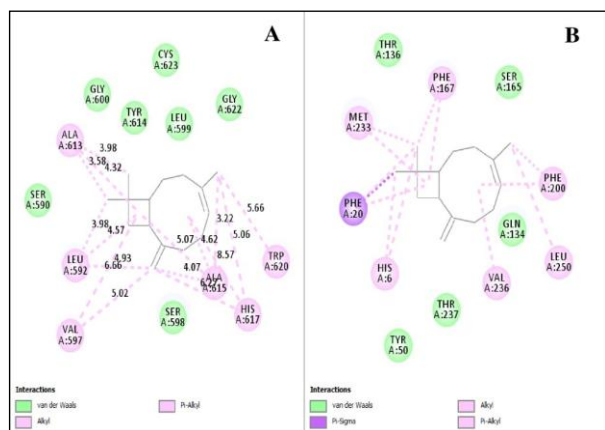


Figure 6: Molecular interactions of β -caryophyllene and residues in the active sites of proteins. (a) 2D representation of interactions with the CPT 2 enzyme. (b) 2D representation of chemical interactions with β -tubulin. Pink imaginary lines represent alkyl and π -alkyl bonds; purple lines are π -sigma bonds; green spheres are van der Waals interactions.

Interactions of β -caryophyllene with β -tubulin involve several key residues. The tetracyclic portion of the ligand and its methyl groups create π -sigma interactions with PHE20, π -alkyl interactions with PHE167 and MET233, and alkyl bonds with HIS6, positioned opposite the methyl groups (Figure 5 (c) and (d)). These tetracyclic rings and methyl groups form an aromatic sandwich between residues PHE20 and PHE167. PHE200, one of the closest residues to the nine-carbon core, engages in both aromatic and π -alkyl interactions with the methyl group at the fourth position. Additionally, the hydrophobic amino acids LEU250 and VAL236 contribute alkyl interactions with the ligand.

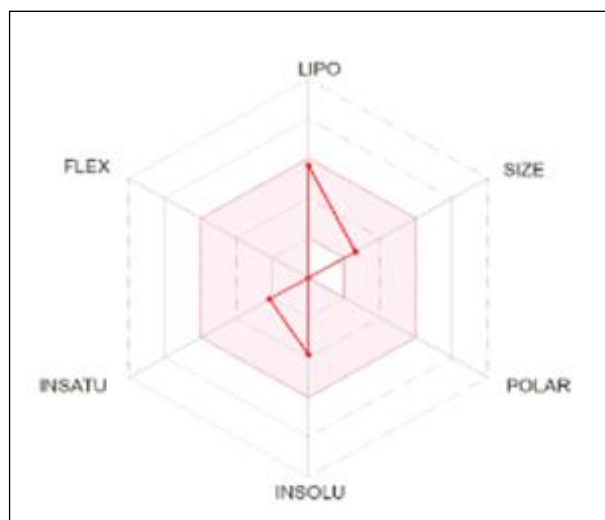


Figure 7: Radar plot of β -caryophyllene.

Figure 6 illustrates that THR136, THR237, TYR50, SER165, and GLN134 all participate in van der Waals interactions with β -caryophyllene in β -tubulin. According to the Swiss ADME analysis of β -caryophyllene's pharmacokinetics, the compound exhibits low gastrointestinal absorption, does not penetrate the blood-brain barrier, and does not inhibit CYP1A2, CYP2D6, or CYP3A4 enzymes. However, it can inhibit CYP19 and CYP2C9 enzymes. β -caryophyllene

aligns with Ghose, Veber, and Egan's rules regarding bioavailability but does not meet Muegge's criteria. It satisfies four of Lipinski's five rules as per the SwissADME web server. The radar plot indicates that the molecular properties of β -caryophyllene fall within acceptable limits for oral administration (Figure 7), suggesting that this molecule merits further investigation as a potential drug candidate.

DISCUSSION AND CONCLUSION

Out of the ten molecules tested for their inhibition properties using the *in silico* docking method, only β -caryophyllene exhibited a ΔG value lower than -8 kcal/mol. The remaining nine compounds did not show inhibition of the two proteins tested. This was likely due to their limited size and fewer side chains, which reduced the diversity and number of potential chemical interactions with the proteins. Although these molecules may have anthelmintic effects, it would be beneficial to test them against other anthelmintic protein targets using *in silico* modelling, as well as to investigate their effects *in vitro*.

The results suggest that the anthelmintic effect of these nine molecules operates through a pathway other than β -tubulin or CPT 2 inhibition. The low binding affinity observed may be attributed to the small size of these monoterpenes. In a previous study, sesquiterpene lactone and arteannuin-B demonstrated favorable binding affinity to the CPT 2 enzyme, facilitating numerous interactions (Karaman et al. 2024). Similarly, stigmaterol and fridelin showed potential to inhibit the CPT 2 enzyme, given their available free energy of binding. These two compounds possess larger cyclic cores (steroidal structures), allowing for multiple aromatic and electrostatic interactions with enzyme residues.

Therefore, having a larger core structure and hydroxyl groups in herbal compounds is crucial for inhibiting anthelmintic targets. Since β -caryophyllene is a sesquiterpene containing a cyclobutane ring and a nine-membered ring, it serves as a more suitable ligand for this type of inhibition compared to smaller monoterpenes (Gertsch et al. 2008).

β -Caryophyllene is an agonist of cannabinoid receptors, which belong to the group of G protein-coupled receptors (Francomano et al. 2019). Some of these G protein-coupled receptors are targets for anthelmintic drugs (Lacey 1990; Martin et al. 2014). Therefore, it is important to conduct docking experiments of β -caryophyllene with the anthelmintic target G protein-coupled receptors.

Molecular docking studies have demonstrated that β -caryophyllene interacts with the hydrophobic amino acid residues of CBR-2 (cannabinoid receptor) at the active site. These residues include VAL113, PHE117, ILE198, TRP258, and MET265. In our study, we found that β -caryophyllene also interacted with hydrophobic residues in the CPT 2 enzyme and β -tubulin. The key amino acid residues identified in the CPT 2 enzyme are TRP620, ALA613, LEU592, VAL597, and ALA615, while those in β -tubulin include GLY134, VAL236, LEU250, PHE200, PHE20, PHE167, and MET233.

Origanum species have been extensively studied for their effectiveness against nematodes and cestodes. For example, a study demonstrated that the essential oil of *O. vulgare* was effective against *Echinococcus granulosus* at a final concentration of $10 \mu\text{g/mL}$ (Pensel et al. 2014). After 72 days of incubation, the protoscolex of *E. granulosus* completely lost its vitality. However, our research showed

that not all nematodes in mice succumbed to the treatment with Origanum essential oil (OEO). This was likely because the treatment period was insufficient to achieve a significant antinematodal effect. Even if all nematodes were eliminated after a more extended treatment, it remained unclear whether the mice were still infected. Therefore, we could not conclusively determine the infection status of the mice, regardless of whether all nematodes had been killed. Additionally, using experimental animals to demonstrate the antiproliferative effect of OEO on *S. obvelata* eggs is inefficient, as OEO can irritate animals, even when diluted and added to their feed. Thus, in vitro studies are more appropriate for demonstrating the antiproliferative effects of OEO on nematodes.

Castro et al. (2013) found that *Origanum* extract had a significant effect on the egg hatching of *Haemonchus contortus*, with the impact varying according to the dose used. The authors concluded that a low concentration of *Origanum vulgare* (10 mg/ml) exhibited ovicidal activity, making it a potential treatment for helminthiasis (Pensel et al. 2014). In a separate study, Andre et al. (2016) demonstrated that carvacrol and carvacryl acetate inhibited the larval development of *H. contortus* at doses of 0.8, 1.0, and 2.0 mg/kg, showing efficacies of 89.3%, 97.7%, and 100%, respectively, as evidenced by larval development and egg-hatching tests. They noted that carvacryl acetate was less toxic than carvacrol and was a more effective anthelmintic both in vitro and in vivo against *H. contortus*, a common nematode affecting sheep (Andre et al. (2016). According to Ozcan et al. (2012), the analysis of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* leaves collected from two regions of Türkiye (Büyükeceli and Delikkaya locations of South Anatolia) showed the presence of twenty-eight compounds described with GC-MS. *Origanum* essential oil was found to be composed of oxygenated monoterpenoids and monoterpenoid hydrocarbons, with the majority of them being carvacrol (ranging from 51.4% to 63.3%), linalool (ranging from 28.3% to 2.3%), γ -terpinene (ranging from 6.0% to 9.9%), and p-cymene (ranging from 4.8% to 8.7%) (Ozcan et al. 2012). In a recent research conducted in Tokat province of Türkiye; Erenler et al. (2023) detected the percentage rate of major compounds in *O. vulgare* L. essential oil as 90.4%, 4.21%, and 1.19% for carvacrol, p-cymene, and γ -terpinene, respectively. In our study, we observed lower rates of certain compounds compared to previous findings. Specifically, carvacrol was present at 84.0%, while linalool was detected in trace amounts, γ -terpinene at 3.5%, and p-cymene at 4.6%. It is essential to recognize that the composition of active compounds in the same species can vary due to environmental factors such as location, soil type, climate zone, and harvesting time.

Additionally, we noted a steady decrease in the number of parasite eggs in mice fed soy oil, which continued up to day 14. This reduction may be attributed to the laxative effect of soy oil or its potential anthelmintic properties.

On the other hand, *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* has been shown to reduce parasite eggs; however, its effects are not long-lasting and require continuous use. A low-dose, repeatable treatment using oregano essential oil (OEO) is recommended, as it has demonstrated effectiveness even at low doses. Further research is needed to explore the anthelmintic effects of carvacrol on other drug target proteins through molecular docking studies.

β -Caryophyllene is a compound found in several plants, including basil (*Ocimum* spp.), cinnamon (*Cinnamomum verum*), and cloves (*Syzygium aromaticum*), as well as in oregano (*Origanum* spp.) (Karaman 2022). These plants are believed to have anthelmintic properties, which can help eliminate parasitic worms. Recent studies predicted that β -caryophyllene may possess anthelmintic effects, and this was demonstrated for the first time through molecular modelling.

Extracts derived from specific plant parts can offer various benefits when utilised in appropriate doses for treatment. They can enhance the immune system of animals through natural means, aiding in the prevention of recurrent helminthic infections due to their antioxidant properties. Additionally, these extracts can help inhibit the development of drug resistance in parasites affecting animals, thereby reducing the dependency on synthetic medications for treatment. Given these advantages, it is increasingly important to explore natural components in the development of anthelmintic drugs.

In this study, we have concluded that *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* grown in Türkiye has a high concentration of carvacrol (84.0%), which makes it a potentially effective therapeutic herb. When mice were treated with a 600 mg/kg dose of OEO, it resulted in a 95.48% reduction in the number of *S. obvelata* eggs on the 14th day post-treatment. The docking results suggest that β -caryophyllene may contribute to the antinematodal effect of *Origanum* essential oil. So, this study can be considered a preliminary study, and future studies should administer OEO to experimental animals using taste-masking methods, controlled-release systems, or oral gavage.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENT

This study is derived from publicly defended PhD of the Dilara KARAMAN named author.

We would like to thank the late Prof. Dr. Hulusi Malyer for providing the *Origanum vulgare* essential oil from Eskişehir Anadolu University, Dr. Nurcihan Güven for her help in the laboratory in determining the oil content, and Prof. Dr. Nurhayat Dalkıran for performing the statistical analyses.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Idea/Concept: DK
Supervision/Consultancy: MK, AOG
Data Collection and/or Processing: DK, OG
Analysis and/or Interpretation: DK, MK
Writing the Article: DK, OG
Critical Review: OG, AOG

REFERENCES

- Adams RP (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4. Edition. Allured Publishing Corporation, Illinois.
- Andre WPP, Ribeiro WLC, Cavalcante GS et al. (2016). Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. *Vet Parasitol*, 218, 52-58.
- Baser KHC (2008). Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Curr Pharm Des*, 14(29), 3106-3119.

- Bell EW, Zhang Y (2019). DockRMSD: An open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. *J Cheminf*, 11, 40.
- BIOVIA (2020). Dassault Systèmes, Discovery Studio Modeling Environment, San Diego. Accessed on 5 May 2025, <https://www.3ds.com/products-services/biovia/>
- Castro LLD, Madrid IM, Aguiar CLG et al. (2013). *Origanum vulgare* (Lamiaceae) ovicidal potential on gastrointestinal nematodes of cattle. *Cienc Anim Bras*, 14, 508-513.
- Ceccarelli SM, Chomienne O, Gubler M, Arduini A (2011). Carnitine palmitoyltransferase (CPT) modulators: a medicinal chemistry perspective on 35 years of research. *J Med Chem*, 54, 3109-3152.
- Celep F, Dirmenci T (2017). Systematic and biogeographic overview of Lamiaceae in Turkey. *Nat Volatiles Essent Oils*, 4(4), 14-27.
- Daina A, Michielin O, Zoete V (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep*, 7, 42717.
- dos Santos JM, Monteiro JP, Ribeiro WLC et al. (2014). Identification and quantification of benzimidazole resistance polymorphisms in *Haemonchus contortus* isolated in Northeastern Brazil. *Vet Parasitol*, 199, 160-164.
- Erenler R, Çarlık ÜE, Aydın A (2023). Antiproliferative activity and cytotoxic effect of essential oil and water extract from *Origanum vulgare* L. *Sigma J Eng Nat Sci*, 41(1), 202-208.
- European Pharmacopoeia (2025). Vol. 1. Council of Europe, Strasbourg. 11th Edition, Accessed on 13 May 2025, <https://pheur.edqm.eu/home>.
- Francomano F, Caruso, A, Barbarossa A et al. (2019). β -Caryophyllene: A sesquiterpene with countless biological properties. *Appl Sci*, 9, 5420.
- Gertsch J, Leonti M, Raduner S et al. (2008). Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 9099-9104.
- Hochmuth DH (2008). MassFinder-4. Hochmuth Scientific Consulting, Hamburg.
- Hsiao YS, Jögl G, Esser V, Tong L (2006). Crystal structure of rat carnitine palmitoyltransferase II (CPT-II). *Biochem Biophys Res Commun*, 346, 974-980.
- Huey R, Morris GM, Olson AJ, Goodsell DS (2007). A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J Comput Chem*, 28, 1145-1652.
- IBM Corp (2020). IBM SPSS Statistics for Windows (Version 27.0).
- Ietswaart JH (1982). *Origanum* L. Davis PH (Ed). Flora of Turkey and East Aegean Islands, Volume 7 (pp. 309-319). Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Jung H, Gonzáles-Esquivel DF (2002). Pharmacology of anticysticercal therapy. Singh G, Prabhakar S (Eds). *Taenia solium* Cysticercosis: From Basic to Clinical Science (pp. 368-371), CABI, Oxfordshire.
- Karaman D, Girişgin AO, Girişgin O, Malyer H (2024). Discovery of new herbal anthelmintics from *Artemisia annua* L. via in silico molecular docking and in vivo extract application. *Sigma J Eng Nat Sci*, 42(1), 198-210.
- Karaman D (2022). Prediction on the Anthelmintic Effects of Some Herbal Ligands and Their Derivatives with In Silico Molecular Modeling Method. PhD Thesis, Bursa Uludag University, Institute of Science, Bursa, Türkiye.
- Kim S, Chen J, Cheng T et al (2021). PubChem in 2021: New data content and improved web interfaces. *Nucleic Acids Res*, 49, 1388-1395.
- Lacey E (1990). Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol Today*, 6, 112-115.
- Lanusse C, Alvarez L, Lifschitz A (2014). Pharmacological knowledge and sustainable anthelmintic therapy in ruminants. *Vet Parasitol*, 204, 18-33.
- Ludwiczuk A, Skalicka-Woźniak K, Georgiev MI (2017). Terpenoids. Badal S, Delgoda R (Eds). Pharmacognosy (pp. 233-266). John Wiley and Sons, New York.
- Martin RJ, Puttachary S, Buxton SK, Verma S, Robertson AP (2014). The conqueror worm: recent advances with cholinergic anthelmintics and techniques excite research for better therapeutic drugs. *J Helminthol*, 29, 1-11.
- McLafferty FW, Stauffer DB (1989). The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data. John Wiley and Sons, New York.
- Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS et al. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and empirical binding free energy function. *J Comput Chem*, 19, 1639-1662.
- Morris GM, Huey R, Lindstrom W et al. (2009). Autodock 4 and Auto Dock Tools 4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*, 30, 2785-2791.
- Ozcan MM, Pedro LG, Al-Juhaimi F et al. (2012). Constituents of the essential oil of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* growing wild in Turkey. *J Essent Oil-Bear Plant*, 15, 572-576.
- Pagano M, Gauvreau K (2018). Principles of Biostatistics, 3. Edition. CRC Press, Florida.
- Pensel PE, Maggiore MA, Gende LB et al. (2014). Efficacy of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* on *Echinococcus granulosus*. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 693289.
- Pisanu B, Chapuis J, Périn R (2003). *Syphacia obvelata* infections and reproduction of male domestic mice *Mus musculus domesticus* on a sub-Antarctic Island. *J Helminthol*, 77, 247-253.
- Protein Data Bank (2025). Research Collaboratory for Structural Bioinformatics-PDB, U.S.A. Accessed on 1 May 2025, <https://www.rcsb.org/pdb>
- Robinson MW, McFerran N, Trudgett A, Hoey L, Fairweather I (2004). A possible model of benzimidazole binding to beta-tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. *J Mol Graph*, 23, 275-284.
- Santoro GF, das Graças-Cardoso M, Guimarães LGL et al. (2007). Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitol Res*, 100, 783-790.
- Taylor CM, Wang Q, Rosa BA et al. (2013). Discovery of anthelmintic drug targets and drugs using chokepoints in nematode metabolic pathways. *PLoS Pathog*, 9, 1003505.
- Taylor MA, Coop RL, Wall RL (2016). Veterinary Parasitology, 4. Edition. Wiley-Blackwell, New Jersey.
- Tyagi R, Maddirala AR, Elfawal M et al. (2018). Small molecule inhibitors of metabolic enzymes repurposed as a new class of anthelmintics. *ACS Infect Dis*, 4, 1130-1145.



Tin (Sn) Levels in Cow's Bulk Tank Milk and Dietary Risk Assessment from Dairy Farms in Industrial and Non-industrial Areas of Hatay Province

Seydi Ahmet ŞENGÜL* 

Hatay Mustafa Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, 31060, Hatay, Türkiye.

Received: 04.11.2025

Accepted: 07.07.2026

ABSTRACT

In this study, it was aimed to compare the tin (Sn) concentrations in raw cow milk samples collected from dairy farms located in industrial and non-industrial areas in Hatay, to reveal the relationship of this element with the proximity of industrial areas and consumption of water and feed, and to reveal the health risks that Sn exposure through the consumption of milk may cause in adult male and female in this region. For this purpose, 12 bulk tank milk samples, 12 water samples and 12 feed samples were collected separately from industrial and non-industrial areas. Estimated daily intake (EDI) and target hazard quotient (THQ) parameters were used for non-carcinogenic risk assessment. In milk samples collected from industrial and non-industrial areas, the mean Sn concentrations were found to be 25.743 mg/L and 24.389 mg/L, respectively. In feed and water samples collected from industrial areas, the mean Sn concentrations were found to be 2.762 mg/kg and 0.041 µg/L, respectively, while those from non-industrial areas were found to be 3.857 mg/kg and 0.218 µg/L, respectively. EDI values determined for the Sn element for adult male and female were calculated as 34.55 µg/L bw/day and 39.74 µg/L bw/day, respectively. In addition, THQ values determined for the Sn element in adult male and female were calculated as 0.057590 and 0.066237, respectively. These findings show that industrial activities in the region contribute to the Sn content in milk and that exposure to this element through the consumption of milk is unlikely to cause any health risks.

Keywords: Industrial, Cow, Tin, Risk assessment, Milk.

ÖZ

Hatay İlinde Endüstriyel ve Endüstriyel Olmayan Bölgelerdeki Süt Çiftliklerinden Toplanan İneklerin Tank Sütünde Kalay (Sn) Düzeyleri ve Diyet Risk Değerlendirmesi

Bu çalışmada, Hatay ilinde endüstriyel ve endüstriyel olmayan bölgelerde bulunan süt çiftliklerinden toplanan çiğ inek sütü örneklerinde kalay (Sn) konsantrasyonlarının karşılaştırılması, bu elementin endüstriyel alanlara yakınlık ve içme suyu ve yem tüketimi ile olan ilişkisinin ortaya koyulması ve süt tüketimi yoluyla Sn maruziyetinin bu bölgedeki yetişkin erkek ve kadın bireylerde oluşturabileceği sağlık risklerinin ortaya koyulması amaçlandı. Bu amaçla, endüstriyel ve endüstriyel olmayan bölgelerden ayrı olarak 12 adet tank sütü örneği, 12 adet su örneği ve 12 adet yem örneği toplandı. Non-kanserojenik risk değerlendirmesi için tahmini günlük alım (TGA) ve hedef tehlike katsayısı (HTK) parametreleri kullanıldı. Endüstriyel ve endüstriyel olmayan bölgelerden toplanan çiğ inek sütü örneklerinde ortalama Sn konsantrasyonları sırasıyla 25.743 mg/L ve 24.389 mg/L olarak bulundu. Endüstriyel alanlardan toplanan yem ve su örneklerinde ortalama Sn konsantrasyonları sırasıyla 2.762 mg/kg ve 0.041 µg/L düzeyinde, endüstriyel olmayan alanlardan toplanan örneklerde ise sırasıyla 3.857 mg/kg ve 0.218 µg/L düzeyinde tespit edildi. Yetişkin erkek ve kadın bireyler için Sn elementinin belirlenen TGA değerleri sırasıyla 34.55 µg/L vücut ağırlığı/gün ve 39.74 µg/L vücut ağırlığı/gün olarak hesaplandı. Ayrıca yetişkin erkek ve kadın bireylerde Sn elementi için belirlenen HTK değerleri sırasıyla 0.057590 ve 0.066237 olarak hesaplandı. Bulgular, bölgedeki endüstriyel faaliyetlerin sütteki Sn içeriğine katkıda bulunduğunu ve süt tüketimi yoluyla bu elemente maruz kalmanın herhangi bir sağlık riski oluşturmasının olası olmadığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Endüstriyel, İnek, Kalay, Risk değerlendirme, Süt.



INTRODUCTION

Cow's milk is an extremely important nutrient source for humans due to its rich vitamin, mineral, carbohydrate, protein and fat content (Dobrzański et al. 2005). However, in addition to these substances, it also contains many toxic elements that can cause serious health problems (Arianejad et al. 2015). Because of this feature, milk could be an important route of toxic metal intake (Ogut et al. 2016). Industrial activities and increasing urbanization are shown among the important reasons for the contamination of milk with these elements (Usman et al. 2023). For this reason, milk is recognized as an important indicator of environmental pollution (Ogut et al. 2016). Contamination of the production environment can cause these elements to accumulate in foods and cause significant health problems due to their cumulative properties (Arianejad et al. 2015). In addition, consumption of contaminated feed and water and the equipment used in production and storage processes are also shown among different contamination sources (Rezaei et al. 2014; Arianejad et al. 2015).

Tin (Sn), which is widely used in various industrial activities and can accumulate in foods, is considered one of the important potentially toxic elements (PTEs) (Arianejad et al. 2015; Astolfi et al. 2020). The reason for the high levels detected in milk compared to other elements is due to the formation of stable and toxic organic Sn as a result of the element's ability to bind with the carbon in the milk structure. In addition, contamination of milk with this element can be attributed to the proximity of production areas to industrial activities and water and feed consumed by animals (Arianejad et al. 2015). It is known that Sn contamination is quite low in areas far from pollution sources (Harper 2005).

In this study, Sn levels were determined in raw cow's milk, drinking water, and feed collected from farms located in industrial and non-industrial areas in Hatay province. We hypothesized that if concentration of this element is higher in drinking water and feed, it may also be elevated in produced milk. In addition, it was aimed to determine to what extent the emissions of this element into the environment due to industrial activities in the region could affect the levels of Sn in milk. Moreover, the milk produced in the industrial areas was compared with the Sn concentrations in raw cow's milk collected from non-industrial areas, which were thought to be uncontaminated. It was also determined whether exposure to this element causes health risks in adults due to consumption of the milk produced.

MATERIAL AND METHODS

Study Areas and Collection of Samples

The dairy farms where milk, drinking water, and feed samples were collected are presented in Figure 1. Raw milk samples were collected from 24 dairy farms, each of which had no fewer than 50 cattle. Within the scope of the study, a total of 24 raw tank milk samples, each with a volume of 50 mL, were collected from dairy farms located in industrial and non-industrial areas of Hatay province. In this study, 12 farms were classified as close to industrial areas (within 15 km radial distance from industrial units), while 12 farms were grouped as far to industrial areas (areas outside of 15 km distance). Simultaneously with milk sampling, 24 feed samples (total mixed ration) weighing 500 g were collected from the feeds consumed by the cows. The collected feed samples were dried in oven

and then homogenized. In addition, a total of 24 drinking water samples were collected in the amount of each 50 mL from each farm. To prevent possible metal contamination, the clean polyethylene sampling bottles (Isolab, Türkiye) used in the collection of milk and drinking water were kept in a 20% nitric acid (HNO₃) (65% purity) (Merck, Germany) solution overnight and then rinsed with ultrapure water (18.2 MΩ/cm resistivity, Millipore, France). All samples were stored at -20°C until further analysis. All samples were obtained during 2021-2022.

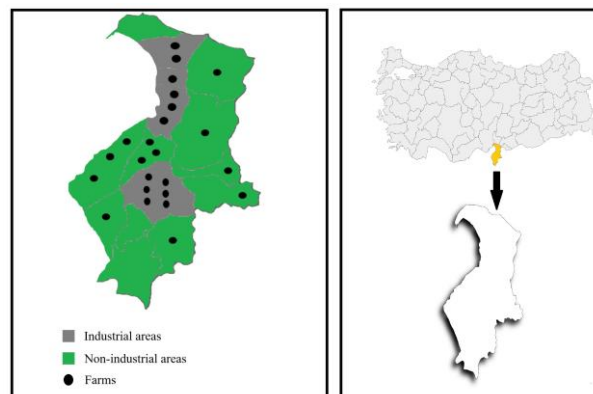


Figure 1: Location of the study area.

Digestion of Milk and Feed Samples

The digestion of milk and feed samples was carried out according to the method described in Nordic Committee on Food Analysis (NMKL) Method 161 (1998). Briefly, 1 mL of milk samples and 0.5 g of feed samples were weighed and placed into polytetrafluoroethylene (PTFE) digestion vessels. Before digestion, to prevent possible contamination, the vessels were kept in HNO₃ solution for 24 h and then rinsed with ultrapure water. Then, 8 mL of HNO₃ (65%) and 2 mL of hydrogen peroxide (H₂O₂) (30%) (Merck, Germany) were added to the samples, and the digestion process was carried out in a microwave oven (MAR SXpress, CEM Corporation, USA) according to a four-step procedure (20 min, 800 watts power, 200 °C). When microwave wet digestion was finished, each digested sample was filtered to polyethylene volumetric flasks and then diluted to a final volume of 25 mL with ultrapure water. Diluted samples were storage at 4°C until further analysis. All chemicals and reagents used in the analyses were of analytical grade.

Calibration Standard Preparation and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) Analysis

Calibration standard concentrations of 0, 5, 20, 50, and 100 ppb in milk and feed samples and 0, 1, 2, 5, and 10 ppb in water samples were prepared for Sn element and calibration curves were obtained. The levels of Sn in all samples were determined by ICP-MS (Analytik Jena AG, Germany) and autosampler (ASX-560, Teledyne CETAC, USA) according to the TS EN ISO 21424 (2020). The water samples were passed through 25 mm/0.45 µm sterile syringe filters (Isolab, Türkiye). Then, the filtered water samples were acidulated to pH<2 by adding HNO₃ according to USEPA Method 200.8 (1994).

Health Risk Assessment

Estimated Daily Intake (EDI) and Non-carcinogenic Risk Assessment

The EDI and non-carcinogenic target hazard quotient (THQ) used to assess the potential health risk from Sn exposure through consumption of raw cow's milk in adults were calculated according to the equation 1 and 2 given below (USEPA 1995; Usman et al. 2023).

$$EDI = \frac{C \times FIR}{BW} \quad \text{eq. 1}$$

Here, C is the concentration Sn element (mg/kg), FIR is the milk ingestion rate (kg/person/year) (39.7 kg for adult per year) (Turkish National Dairy Council 2020), BW is the average body weight (78.9 kg for adult male, 68.6 kg for adult female) (TURKSTAT 2022).

$$THQ = \frac{EDI}{RfD_o} \quad \text{eq. 2}$$

Where EDI is already explained, RfD_o is the oral reference dose (0.6 mg/kg/day for Sn) (USEPA 2016). A THQ value below 1 indicates that there is no consumption-related health risk (USEPA 1995).

Statistical Analysis

Descriptive statistical data were shown as mean±standard deviation (SD). Repeated measures ANOVA were used to evaluate the effect of region on the mean Sn levels in milk samples. One-way analysis of variance was used to evaluate the effect of region on the mean Sn levels in water and feed samples. The relationship between the Sn levels

in milk samples and the Sn levels in water and feed samples in each region was calculated by Pearson correlation coefficients. IBM SPSS 23.0 (Armonk, NY: IBM Corp.) package programme was used in all statistical analyses. The value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

The Mean Concentrations of Sn Element in Raw Cows' Milk, Feed, and Water Samples Collected from Industrial and Non-industrial Areas

The results of Sn element were determined in milk, feed, and water samples are presented in Table 1.

The mean Sn level in raw milk samples collected from industrial areas was found to be 25.743 mg/L, with values between 22.432 and 28.548 mg/L. The mean Sn level in raw milk samples collected from non-industrial areas was found to be 24.389 mg/L, with values between 19.988 and 33.301 mg/L ($p=0.279$) (Figure 2).

Table 1: Mean concentrations of Sn in milk, feed, and water samples from industrial and non-industrial areas and risk assessment.

		Areas		EDI		THQ	
		Industrial	Non-industrial	Male	Female	Male	Female
Milk	N	12	12				
	Mean±SD (mg/L)	25.743±2.039	24.389±3.697	34.55	39.74	0.057590	0.066237
	Min-Max	22.432-28.548	19.988-33.301				
	p	0.279					
Feed	N	12	12				
	Mean±SD (mg/kg)	2.762±1.198	3.857±1.689				
	Min-Max	0.619-4.895	1.844-8.084				
	p	0.081					
Water	N	12	12				
	Mean±SD (µg/L)	0.041±0.070	0.218±0.614				
	Min-Max	0-0.197	0-2.157				
	p	0.332					

N: Number of samples. Min-Max: Minimum-Maximum.

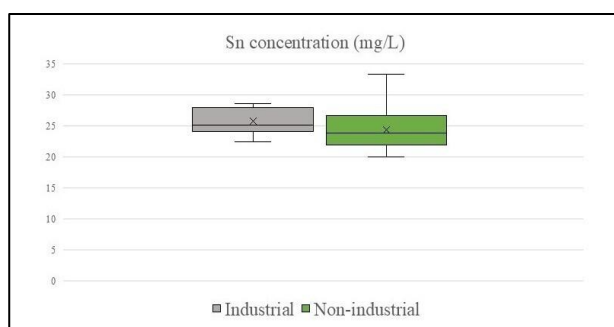


Figure 2: Mean Sn concentrations in raw cow milk.

The mean Sn level in feed samples collected from industrial areas was found to be 2.762 mg/kg, with values between 0.619 and 4.895 mg/kg. The mean Sn level in drinking water samples collected from industrial areas was found to be 0.041 µg/L, with values between 0 and 0.197 µg/L. The mean Sn level in feed samples collected from non-industrial areas was found to be 3.857 mg/kg, with values between 1.844 and 8.084 mg/kg. The mean Sn level in drinking water samples collected from non-industrial areas was found to be 0.218 µg/L, with values between 0 and 2.157 µg/L.

Correlation Between Sn Content in Milk with that in Water and Feed

Correlation coefficients showing the relationship between Sn levels in milk samples and Sn levels in drinking water and feed samples are presented in Table 2. There was no significant correlation between Sn concentrations in milk, drinking water and feed in both regions.

Table 2: Pearson's correlation coefficients between Sn concentrations in milk, feed, and water samples.

Milk	Industrial areas		Non-industrial areas	
	Feed	Water	Feed	Water
r	-0.280	0.568	-0.131	-0.203
p	0.378	0.054	0.684	0.528

r: Correlation coefficients.

Human Health Risk Assessment

The calculated EDI and THQ values for the exposure of adult male and female individuals to the Sn element in milk through consumption are presented in Table 1. Accordingly, the EDI values determined for the Sn element for male and female individuals were calculated as 34.55 µg/L bw/day and 39.74 µg/L bw/day, respectively. According to the non-carcinogenic risk assessment, the THQ values determined for the Sn element in male and female individuals were calculated as 0.057590 and 0.066237, respectively.

DISCUSSION AND CONCLUSION

In our study, it was observed that the mean Sn levels detected in cow milk collected from industrial areas were higher than the levels detected in milk collected from non-industrial areas. This situation may be thought to be due to the higher Sn emissions to the environment in areas where industrial activities are maintained. In industrial areas, Sn is released into the atmosphere as a result of the emissions of waste disposed of by incineration. The remoteness of contamination sources ensures that environmental levels of Sn are generally low (Harper 2005). There are a limited number of studies in the literature on Sn content in cow's milk. Therefore, the determination of this element's levels in milk, the assessment of exposure-related risks, and the examination of its correlation with environmental factors are considerably important. Usman et al. (2023) reported that they detected mean Sn levels in cow's milk collected from regions where mining activities are maintained in Northwestern Nigeria in the range of 0.090 to 0.130 mg/kg. In a study of 100 cow's milk samples in China, Chen et al. (2020) reported that the mean Sn concentration was found to be 97.6 µg/kg. In Iran, Rezaei et al. (2014) were found the mean Sn level in milk to be 4.8 µg/L. In another study conducted on cow's milk in Egypt by Enb et al. (2009), the mean Sn level was determined to be 0.003 mg/kg. In a study of 238 raw cow's milk samples in Italy by Stocco et al. (2019), the mean Sn level was reported to be 271 µg/kg. Birghila et al. (2008) determined the mean Sn level to be 0.10 ppm in their study on raw cow's milk in Romania. Gabryszuk et al. (2008) found the mean Sn concentrations in raw cow's milk collected from conventional and organic farms in Poland to be in the range of 12.3-15.4 µg/L. Again, the mean Sn levels detected in raw cow's milk collected from organic and conventional farms in Southern England by Qin et al. (2021) are 2.68 µg/kg and 2.66 µg/kg, respectively. Ogut et al. (2016) did not detect Sn in raw milk collected from industrial and rural areas in Türkiye. It was observed that the reported mean values were lower than the levels detected in the present study. This may be attributed to the fact that the industrial activities maintained in our study area and the Sn-contaminated drinking water and feed consumed by animals contribute more to the Sn content in milk compared to other study areas. It was reported by Astolfi et al. (2020) and Toscano et al. (2023) in Italy and Newton et al. (2023) in Southeast England that Sn element was not detected in cow milk. This may be thought to be due to the fact that the lack of industrial activities in these regions, unlike our study region, significantly reduced Sn contamination in the milk produced. In contrast to our current results, in a similar study conducted by Arianejad et al. (2015) in Iran, it was observed that the mean Sn levels in raw cow milk collected from industrial areas were lower than the levels detected in milk produced in traditional farms. It is noteworthy that, in the present study as well, elevated Sn contamination was observed not only in milk produced in industrial areas but also in milk produced in areas far from industrial activities. This suggests that the observed Sn contamination in milk produced in areas far from industrial activities may originate from milk storage equipment.

EDI and THQ values were determined to reveal the health risk assessment of exposure to the Sn element through the consumption of milk. It was determined that the THQ values determined for the Sn element in milk for adult male and female individuals were lower than 1. This indicates that exposure to the Sn element through the

consumption of milk produced in the region does not pose a risk for adult male and female individuals and that their consumption is safe. In the literature, there is only 1 study that has investigated whether exposure to Sn element through milk consumption poses a health risk. In the non-carcinogenic risk assessment conducted by Usman et al. (2023), it was reported that the THQ values calculated for Sn element in cow's milk consumed in different regions were all less than 1 and that exposure to this element through milk consumption in these regions would not cause any health risk in adults.

This study is the first report showing the possible contamination sources relationship with Sn content in milk produced in the region and evaluating the potential health risk associated with the consumption of milk in adults. In the study, according to the non-carcinogenic risk assessment, it was revealed that the consumption of raw milk does not pose any toxicological risk in the Hatay province. However, since elements have a cumulative property, it is thought that regularly food analyses should be done to evaluate the toxicological risk.

CONFLICTS OF INTEREST

The author reports no conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Idea/Concept: SAŞ

Audit/Consultancy: SAŞ

Data Collection and/or Processing: SAŞ

Analysis and/or Interpretation: SAŞ

Article Written by: SAŞ

Critical Review: SAŞ

REFERENCES

- Arianejad M, Alizadeh M, Bahrami A, Arefhoseini SR (2015). Levels of Some Heavy Metals in Raw Cow's Milk from Selected Milk Production Sites in Iran: Is There any Health Concern? *HPP*, 5(3), 176-182.
- Astolfi ML, Marconi E, Protano C, Canepari S (2020). Comparative elemental analysis of dairy milk and plant-based milk alternatives. *Food Control*, 107327.
- Birghila S, Dobrinas S, Stanciu G, Soceanu A (2008). Determination of major and minor elements in milk through ICP-AES. *Environ Eng Manag J*, 7(6), 805-808.
- Chen L, Li X, Li Z, Deng L (2020). Analysis of 17 elements in cow, goat, buffalo, yak, and camel milk by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *RSC Adv*, 10(12), 6736-6742.
- Dobrzański Z, Kolacz R, Górecka H, Chojnacka K, Bartkowiak A (2005). The Content of Microelements and Trace Elements in Raw Milk from Cows in the Silesian Region. *Pol J Environ Stud*, 14(5), 685-689.
- Enb A, Abou Donia MA, Abd-Rabou NS, Abou-Arab AAK, El-Senaity MH (2009). Chemical Composition of Raw Milk and Heavy Metals Behavior During Processing of Milk Products. *Glob Vet*, 3(3), 268-275.
- Gabryszuk M, Słoniewski K, Sakowski T (2008). Macro- and microelements in milk and hair of cows from conventional vs. organic farms. *Anim Sci Pap Rep*, 26(3), 199-209.
- Harper C, Lladós F, Diamond G, Chappell LL (2005). Toxicological profile for tin and tin compounds. Accession date: 24 June 2025. Accession link: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp55.pdf>.
- Newton EE, Pétursdóttir ÁH, Beauclercq S et al. (2023). Variation in macrominerals and trace elements in cows' retail milk and implications for consumers nutrition. *Food Chem*, 418, 135809.
- NMKL (Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler Nordic Committee on Food Analysis) (1998). Metals. Determination by atomic absorption spectrophotometry after wet digestion in a microwave oven. NMKL Method No 161.
- Ogut S, Secilimis Canbay H, Uludag H (2016). Effect of Environmental Factors on Heavy Metal Content of Raw Milk. *Akademik Gıda*, 14(2), 105-110.
- Qin N, Faludi G, Beauclercq S et al. (2021). Macromineral and trace element concentrations and their seasonal variation in milk from organic and conventional dairy herds. *Food Chem*, 359, 129865.

- Rezaei M, Dastjerdi HA, Jafari H et al. (2014).** Assessment of dairy products consumed on the Arakmarket as determined by heavy metal residues. *Health*, 6, 323-327.
- Stocco G, Summer A, Malacarne M, Cecchinato A, Bittante G (2019).** Detailed macro- and micromineral profile of milk: Effects of herd productivity, parity, and stage of lactation of cows of 6 dairy and dual-purpose breeds. *JDS*, 102(11), 9727-9739.
- Toscano A, Giannuzzi D, Pegolo S et al. (2023).** Associations between the detailed milk mineral profile, milk composition, and metabolic status in Holstein cows. *JDS*, 106(9), 6577-6591.
- Turkish National Dairy Council (2020).** Milk Report, Dairy Sector Statistics in the World and Turkey. Accession date: 19 May 2025. Accession link: <https://ulusalsutkonseyi.org.tr/wp-content/uploads/Sut-Sektor-Istatistikleri-2020.pdf>.
- Turkish Standards Institution (TSE) (2020).** Milk, milk products, infant formula and adult nutritional-Determination of minerals and trace elements-Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) method. TS EN ISO 21424:1-44.
- Turkish Statistical Institute (TURKSTAT) (2022).** Accession date: 20 June 2025. Accession link: <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/DownloadIstatistikselTablo?p=%20W%20EBW229PP/91tMV2m71fU6pRWq2F1ZD/lzOFFk0bNDi2rjAC8QDCRN62nr2M3n1K>.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) (1994).** Determination of Trace Elements in Waters and Wastes by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. Method 200.8, 1-57, Revision 5.4. EMMC Version.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) (1995).** EPA Region III Risk-Based Concentration Table. Accession date: 15 June 2025. Accession link: <https://hwbdocuments.env.nm.gov/Los%20Alamos%20National%20Labs/References/9642.PDF>.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) (2016).** Risk-Based Concentration Table. Accession date: 26 June 2025. Accession link: https://archive.epa.gov/region9/superfund/web/pdf/master_sl_table_run_june2015_rev.pdf.
- Usman AT, Abugu HO, Okoye COB (2023).** Preliminary investigation of pollution, impact on milk quality and health risk of potentially toxic elements in raw milk from free-ranging cattle bred in Northwestern Nigeria. *J Environ Anal Chem*, 104(18), 7261-7280.



Research Trends and Scientific Progress in *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) Studies

Milad AFŞAR^{1,*} Muhammed YASUL² Sadi ELASAN³ Hasan YILMAZ¹

¹ Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Medicine, Department of Parasitology, 65080, Van, Türkiye

² Bartın University, Bartın Vocational School of Health Services, Department of Health Care Services, 74100, Bartın, Türkiye

³ Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Medicine, Department of Biostatistics, 65080, Van, Türkiye

Received: 19.11.2025

Accepted: 15.04.2026

ABSTRACT

Culicoides species are important in public health and veterinary medicine as biological vectors of various pathogens. These species play a role in the epidemiology of certain viral infections, particularly in farm animals, and cause economic losses. Additionally, they can trigger hypersensitivity reactions related to their blood-feeding activities. Therefore, monitoring the distribution, diversity, and population dynamics of *Culicoides* species is a critical component of vector control and surveillance efforts. This study subjected 290 scientific publications on *Culicoides* spp. from 1975 to 2025 to bibliometric analysis using VOSviewer software. Using text mining and data visualization techniques, global research trends and thematic focuses related to these parasitic vectors were revealed. Research on *Culicoides* has demonstrated a strong growth trend that became apparent after 2009. While the main focus areas of the studies are Veterinary Sciences (34.8%) and Entomology (20.0%), the United States (28.3%) and various European countries dominate global research output. The field stands out for its publications in journals with high standards in terms of methodological rigor and academic impact, with an analysis of 290 articles receiving a total of 5849 citations supporting these findings. This study is the first comprehensive bibliometric analysis conducted on *Culicoides* spp. The most frequently used keyword is "Bluetongue virus," the most researched field is veterinary science, and the most productive country is the United States. This analysis reveals global trends in *Culicoides* research, providing an important guide for future research directions.

Keywords: Bibliometric analysis, *Culicoides* spp., Vector-borne diseases.

ÖZ

Culicoides spp. (Diptera: Ceratopogonidae) Çalışmalarında Araştırma Eğilimleri ve Bilimsel Gelişmeler

Culicoides türleri, çeşitli patojenlerin biyolojik vektörü olarak halk sağlığı ve veteriner hekimlikte önemlidir. Bu türler, özellikle çiftlik hayvanlarında bazı viral enfeksiyonların epidemiyolojisinde rol oynar ve ekonomik kayıplara neden olur. Ayrıca, kan emme aktivitelerine bağlı aşırı duyarlılık reaksiyonları oluşturabilirler. Bu nedenle, *Culicoides* türlerinin dağılımı, çeşitliliği ve popülasyon dinamiğinin izlenmesi, vektör kontrolü ve sürveyans çalışmalarının önemli bir bileşenidir. Bu çalışmada, 1975'ten 2025'e kadar *Culicoides* spp. ile ilgili 290 bilimsel yayın, VOSviewer yazılımı kullanılarak bibliyometrik analize tabi tutulmuştur. Metin madenciliği ve veri görselleştirme teknikleri kullanılarak, bu parazitik vektörlerle ilgili küresel araştırma eğilimleri ve tematik odak noktaları ortaya çıkarılmıştır. *Culicoides* üzerine yapılan araştırmalar, 2009'dan sonra belirginleşen güçlü bir büyüme eğilimi göstermiştir. Çalışmaların ana odak alanları Veteriner Bilimleri (%34,8) ve Entomoloji (%20,0) olmakla birlikte, küresel araştırma çıktıları ABD (%28,3) ve çeşitli Avrupa ülkeleri tarafından domine edilmektedir. Bu alan, metodolojik titizlik ve akademik etki açısından yüksek standartlara sahip dergilerde yayınlanan makalelerle öne çıkmaktadır. Bu bulguları destekleyen 290 makalenin analizi, toplam 5849 atıf almıştır. Bu çalışma, *Culicoides* spp. üzerine yapılan ilk kapsamlı bibliyometrik analizdir. En sık kullanılan anahtar kelime "Bluetongue virüsü", en çok araştırılan alan veterinerlik bilimi ve en üretken ülke Amerika Birleşik Devletleri'dir. Bu analiz, *Culicoides* araştırmalarındaki küresel eğilimleri ortaya koyarak, gelecekteki araştırma yönelimleri için önemli bir kılavuz sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Bibliyometrik analiz, *Culicoides* spp., Vektör kaynaklı hastalıklar.



INTRODUCTION

Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) species are hematophagous Diptera members measuring 1-3 mm in size and serve as biological vectors for important viral pathogens such as Bluetongue and African horse sickness (Harrup et al. 2015; Yeşilöz et al. 2025). The primary current economic importance of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) currently have major economic importance due to their role as biological vectors of pathogenic arboviruses such as the Bluetongue virus (BTV), Epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV), Schmallenberg virus (SBV) and African horse sickness virus (AHSV). These viruses cause serious diseases in ruminants, deer, and other ungulates and are listed as notifiable epizootic animal diseases by the World Organization for Animal Health (OIE) (Elbers et al. 2013; Yeşilöz et al. 2025).

The genus *Culicoides* is commonly known as biting midges and no-see-ums and taxonomically includes over 1,400 identified species. A significant portion of these species are hematophagous and feed on the blood of humans and various animals; many also serve as biological vectors for animal pathogens, causing significant allergic and pathological reactions (Borkent 2016). Although the first records of the *Culicoides* fauna in Türkiye are attributed to Kieffer, he has also described numerous species found in Türkiye. Systematic research on *Culicoides* in Türkiye has progressed adding many new records. Subsequently, Yılmaz's study in the Elazığ region identified 42 species, expanding the species inventory adding many new records. A study compiled by Dik reported this number as 61 species, and subsequently, Korkmaz et al. increased this number to 72 by recording additional species in a comprehensive field study across 51 provinces (Kieffer 1918; Dik 1989; Yılmaz 1994; Korkmaz et al. 2021).

Culicoides species cause allergic skin reactions (culicoidosis) in humans and animals, characterized by severe itching, leading to significant disturbances in host behavior, such as displacement and escape to indoor environments. Since females feed by sucking blood from animals and humans, *Culicoides* biting midges appear to be important vectors from both veterinary and medical perspectives. However, the most critical role of these species in public health is their ability to transmit the Oropouche virus (OROV), the causative agent of Oropouche fever, a febrile illness in humans (Turgut et al. 2022; Deniz et al. 2023).

The primary objective of this study is to present a comprehensive bibliometric analysis that quantitatively evaluates scientific publications on *Culicoides* spp. on a global scale. The research aims to reveal current research trends, intellectual structure, and scientific productivity dynamics by examining the metric data of the relevant literature. Bibliometric studies on vector-borne diseases and *Culicoides* spp. in the current literature have demonstrated that such analyses enable the systematic mapping of knowledge accumulation, research gaps, and academic orientations in the field. This study also aims to provide insights into global research trends by evaluating the scientific production profiles of developed and developing countries from a comparative perspective.

MATERIAL AND METHODS

Search Strategy and Data Collection

This bibliometric study aims to conduct a comprehensive analysis of scientific publications on the *Culicoides* taxon

published globally between 1975 and 2025. A search using the keyword "*Culicoides* spp." in the Web of Science (WoS) database yielded a total of 290 records. Publications prior to 1975, studies not directly related to the topic, and publication types other than research articles (case reports, editorial articles, letters, etc.) were excluded from the analysis. Only original research articles published in peer-reviewed journals were included in the evaluation, and the final analysis was conducted on 290 eligible articles.

Bibliographic information such as titles, author names, publication years, journal names, and numbers of citations for articles retrieved, has been systematically recorded. The entire dataset has been exported in plain text (TXT) format and archived under the file name "downloadable text." Van Yuzuncu Yil University's online library systems and digital resources were used in the data collection process. Literature review and data analysis were conducted exclusively in English.

Data Analyses

In this bibliometric analysis, VOSviewer software (version 1.6.20, Leiden University, Netherlands) was used to determine global trends, collaboration networks, thematic focuses, and emerging research directions related to *Culicoides* studies (Van Eck and Waltman 2022). VOSviewer is an effective tool specifically developed for network visualization of large-scale bibliometric data sets. During the systematic data collection phase, the WoS database was used as the basis, and the bibliographic data of all articles included in the final analysis were transferred into VOSviewer and evaluated using the software's calculation and mapping algorithms. The results were interpreted from an integrated perspective.

Within the scope of this study, collaborations at the country/region and institutional levels, author contributions, and keyword analyses were conducted. Microsoft Office Excel 2019 software was used to evaluate temporal trends, while text mining and data visualization techniques (including bubble maps and multiple graph types) were utilized to support the validity and reliability of the findings.

RESULTS

This study analyzed 290 scientific articles compiled from the WoS database and 5849 citations attributed to these articles. The analysis revealed an average number of citations per article of 20.17 and an H-index of 39. A significant increase was observed in both the annual number of publications and the number of citations, particularly after 2009. This continuous increase in publication and citation numbers is considered an indicator of the field's increasing bibliometric momentum. These annual distributions and trends are visualized in Figure 1.

The disciplinary distribution of the analyzed publications reveals a clear concentration of scientific production around specific thematic areas. The five main research areas that stand out in terms of publication volume are Veterinary Sciences (34.8%), Entomology (20.0%), Parasitology (11.4%), Tropical Medicine (5.9%), and Infectious Diseases (5.2%). This distribution indicates that these five disciplines, which account for approximately three-quarters of the total articles (77.3%), constitute the fundamental backbone of the literature in question (Table 1).

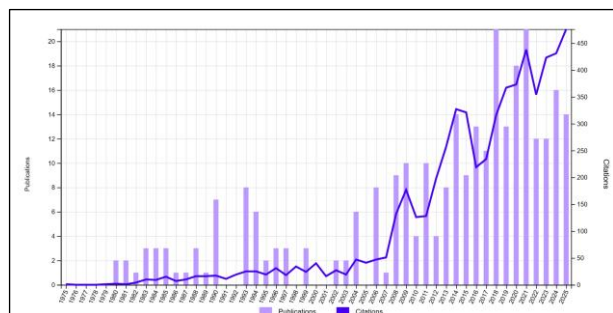


Figure 1: Annual Number of Publications and Citations in *Culicoides* Research Worldwide, Based on the Web of Science Database (1975–2025).

Table 1: Categorization of publications on *Culicoides* spp. according to global research areas, based on Web of Science Data (1975–2025).

Research Areas	Record Count	% of 290
Veterinary Sciences	174	34.828
Entomology	101	20.000
Parasitology	58	11.379
Tropical Medicine	33	5.862
Infectious Diseases	17	5.172
Immunology	15	3.103
Microbiology	9	3.103
Virology	9	2.759
Public Environmental Occupational Health	8	2.414
Agriculture	7	2.414
Science Technology Other Topics	7	1.724
Dermatology	5	1.724
Zoology	5	1.379
Biotechnology Applied Microbiology	4	1.379
Environmental Sciences Ecology	4	0.690
Allergy	2	0.345
Biochemistry Molecular Biology	1	0.345
General Internal Medicine	1	0.345
Genetics Heredity	1	0.345
History	1	0.345
Life Sciences Biomedicine Other Topics	1	0.345
Research Experimental Medicine	1	0.345

The top 22 research areas with the highest rates.

A bibliometric profile analysis of publication frequency by country indicates a significant geographic concentration in global research output. The data show that the United States contributed the largest volume, with 82 articles, accounting for 28.3% of total publications. This finding confirms the United States' leading position in scientific production in this field. The top-ranked country is followed by strong participation from Europe, with Germany (n=42; 14.5%), the England (n=38; 13.1%), Switzerland (n=23; 7.9%), and Spain (n=19; 6.5%) among the top five countries. The combined contributions of these five countries form the fundamental backbone of the global research network. The full list and numerical distribution of the top 25 countries are detailed in Table 2 (Figure 2).

Bibliometric analysis of institutional publication productivity revealed significant institutional concentration in research output. The institutions with the highest publication volumes were the United States Department of Agriculture (USDA) (8.3%), the Florida State University System (7.9%), the Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC) (7.6%), the Pirbright Institute (7.6%), and the UK Institute for Research and Innovation (7.6%). Remarkably, the top five

institutions contribute approximately 39% of total publications, suggesting that the research agenda in this field is largely shaped by these leading institutions. A comprehensive analysis of the top 25 institutions, detailing the network mapping of institutional collaborations and their publication productivity, is presented in Table 3 (Figure 3).

Table 2: According to Web of Science (WoS) data, the top 25 countries publishing on *Culicoides* between 1975 and 2025.

Countries/Regions	Record Count	% of 290
USA	82	28.276
England	38	14.483
Germany	42	13.103
Switzerland	23	7.931
Spain	19	6.552
France	18	6.207
Netherlands	14	4.828
South Africa	14	4.828
Australia	13	4.483
Austria	13	4.483
Brazil	11	3.793
Iceland	11	3.793
India	11	3.793
Italy	11	3.793
Poland	11	3.793
Belgium	10	3.448
Israel	10	3.448
Thailand	10	3.448
Peoples R China	9	3.103
Ireland	8	2.759
Japan	8	2.759
Romania	8	2.759
Scotland	8	2.759
Türkiye	8	2.759
Czech Republic	5	1.724

The top 25 Countries/Regions with the highest rates.

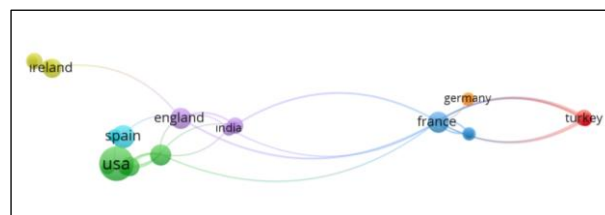


Figure 2: Global Collaborative Network of Countries in *Culicoides* Research (1975–2025).

Data Source: Web of Science. Note: It visualizes the global network of collaborations in *Culicoides* research spanning the period 1975–2025. The visual reveals a dense cluster of collaborations, with Ireland exhibiting strong connections primarily with Spain, the United States (US), and the England. This centralized structure suggests a high level of collaborative research projects and knowledge exchange between these countries.

Indexing analysis based on the WoS database revealed a distinct trend in the distribution of the reviewed publications. The overwhelming majority of articles (96.2%) were indexed in the Science Citation Index Expanded (SCI-Expanded) category, which encompasses high-impact journals. Other indexes that fall well behind this main category are the Emerging Sources Citation Index (ESCI) (3.8%) and the Conference Proceedings Citation Index – Science (CPCI-S) (1.0%). The inclusion of almost all of the existing literature in SCI-Expanded indicates that the research is conducted on platforms with high quality standards in terms of methodological soundness and academic impact (Table 4, Figure 4).

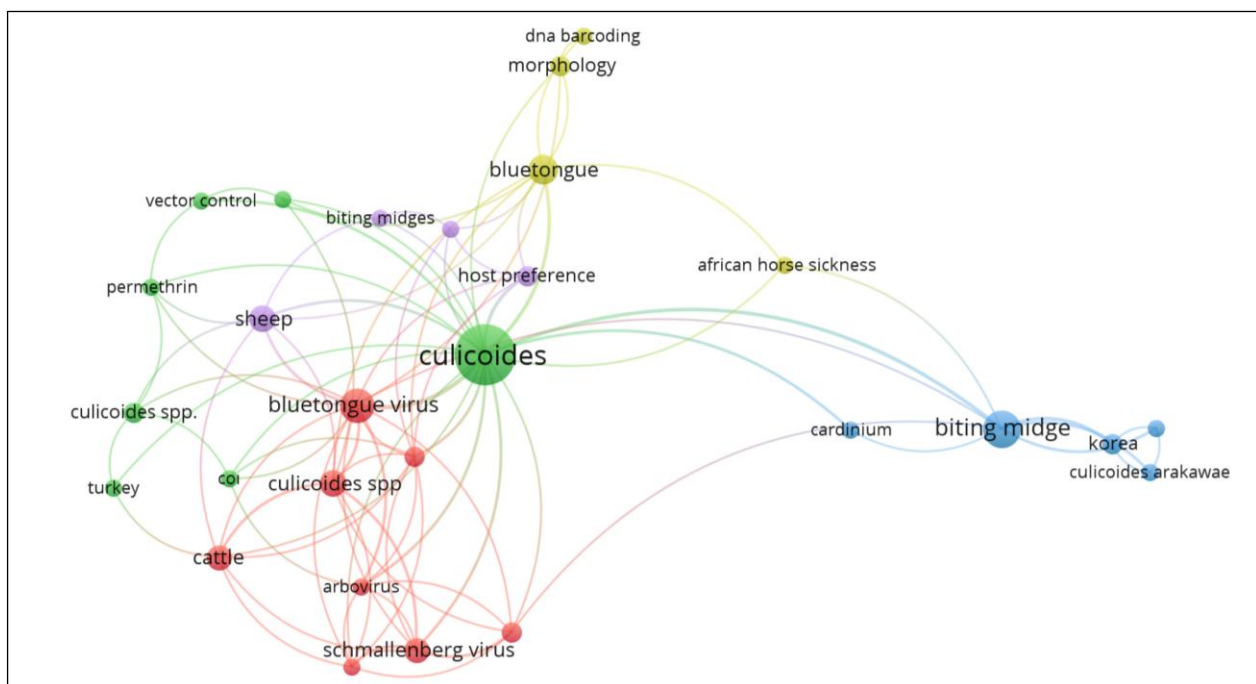
Table 3: Leading institutions in *Culicoides* research by publication output: Top 25 rankings based on Web of Science data (1975–2025).

Affiliations	Record Count	% of 290
United States Department of Agriculture USD	24	8.276
State University System of Florida	23	7.931
Biotechnology And Biological Sciences Research Council BBSRC	22	7.586
Pirbright Institute	22	7.586
Uk Research Innovation UKR	22	7.586
University of Florida	22	7.586
University of Bern	13	4.483
Utrecht University	13	4.483
University of California System	11	3.793
University of Veterinary Medicine Hannover	11	3.793
Cirad	10	3.448
University of Iceland	10	3.448
University System of Georgia	10	3.448
Wageningen University Research	10	3.448
Friedrich Loeffler Institute	9	3.103
Kimron Veterinary Institute	9	3.103
Leibniz Association	9	3.103
National Veterinary Institute National Research Institute	9	3.103
University of California Davis	9	3.103
University of Pretoria	9	3.103
University of Veterinary Medicine Vienna	9	3.103
University of Zurich	9	3.103
Inrae	8	2.759
Universite De Strasbourg	8	2.759
Universitas De Strasbourg Establishments Associes	8	2.759

The top 25 institutions with the highest rates.

Table 4: Web of Science categories used to identify global publications on *Culicoides* (1975–2025).

WEB OF SCIENCE INDEX	Record Count	% of 290
Science Citation Index Expanded (SCI-EXPANDED)	279	96.207
Emerging Sources Citation Index (ESCI)	11	3.793
Conference Proceedings Citation Index – Science (CPCI-S)	3	1.034

**Figure 3:** Bibliometric mapping of institutional productivity and collaboration in *Culicoides* research (1975–2025).

Note: A word cloud or concept map showing the results of a bibliometric analysis of *Culicoides* research. The distribution and size of the keywords in the image reflect research trends, focuses, and scientific collaborations in this field between 1975 and 2025.

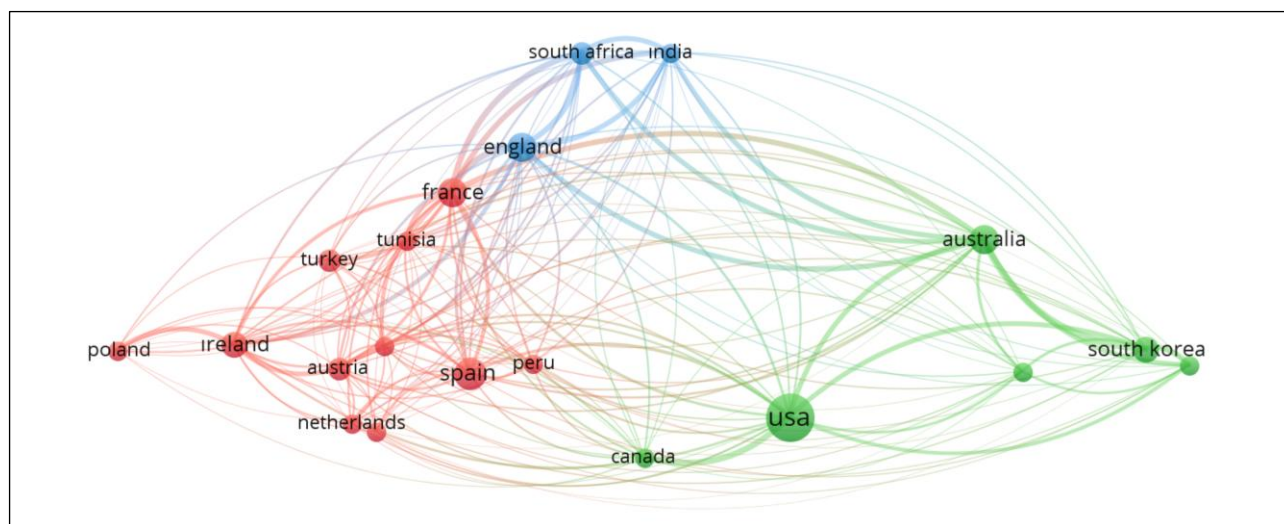


Figure 4. Mapping intellectual alliances: A bibliographic coupling analysis of countries in *Culicoides* research (1975–2025). Note: presents a bibliographic coupling analysis, which delineates the intellectual alliances among countries based on shared reference lists within the *Culicoides* research domain from 1975 to 2025. This methodology effectively maps the underlying intellectual structure and knowledge base of the field, revealing distinct thematic clusters where countries are investigating closely related topics.

DISCUSSION AND CONCLUSION

Bibliometric analysis serves as a quantitative data analysis methodology that facilitates the assessment of scientific publications, theses, and academic productivity within a given field. In recent decades, these approaches have gained prominence in medical literature, allowing for systematic evaluation of scholarly output. Such analyses are typically performed using specialized databases and are often enhanced through data visualization tools, thereby offering novel insights and perspectives to researchers in the discipline. A growing body of literature has employed major indexing databases such as Web of Science Core Collection (WoSCC), Scopus, PubMed, and MEDLINE to conduct comprehensive bibliometric assessments (Dahdi et al. 2018; Alırvacı 2022; Afşar et al. 2024; Yıldız et al. 2024). The role of bibliometric analysis in medical research continues to expand in both scope and significance. Academic journals function as fundamental communication channels, enabling researchers to disseminate their work to the global scientific community. Consequently, a journal's academic standing is closely tied to the scientific impact and performance of the studies it publishes (Maciver et al. 2020; Durgun 2021; Yıldız 2022; Afsar et al. 2025).

Although there are many valuable studies on *Culicoides* spp. in the academic literature, integrative analyses that provide a systematic map of existing studies and identify future research directions using quantitative data remain limited (Kieffer 1918; Dik 1989; Yılmaz 1994; Elbers et al. 2013; Harrup et al. 2015; Borkent 2016; Korkmaz et al. 2021; Turgut et al. 2022; Deniz et al. 2023; Yeşilöz et al. 2025). The current literature provides critical data on the epidemiology, pathogenesis, clinical course, and prevention strategies of the disease in question and establishes a conceptual framework for future research in the field. This study has revealed a significant global increase in scientific publications related to *Culicoides* spp. in recent years. The main objectives of the research are to systematically map global trends in *Culicoides* spp.-focused studies, emerging research clusters, thematic focal points, and geographical distribution patterns. Furthermore, through the analysis of leading journals, influential authors, and fundamental studies in the field, gaps in the

existing literature have been identified, and priority directions for future research have been proposed.

A search using the keyword *Culicoides* in the WoS database identified 310 articles, of which 290 were included in the final analysis. When examining the chronological distribution of the studies, it was observed that there were a very limited number of publications before 1975, but interest in the subject increased significantly from 2009 onwards. The number of publications peaked in 2018 and 2021, indicating that scientific productivity in this field has increased significantly in recent years. When examining the distribution of research areas, it was observed that (34.8%) of the studies were concentrated in the field of Veterinary Sciences. This was followed by Entomology with (20%) and Parasitology with (11.4%). Other important research areas include Tropical Medicine (5.9%), Infectious Diseases (5.2%), and Immunology (3.1%). This distribution shows that *Culicoides* research is primarily focused on veterinary medicine and vector biology, while the human health dimension has been less studied. This focus in the current literature indicates significant research gaps, particularly in areas such as public health, clinical management, and advanced molecular pathogenesis studies. This thematic profile reflects a multidisciplinary approach centered on the "One Health" concept, which is directly linked to public health and global food security, including the transmission dynamics of zoonotic pathogens, vector-borne diseases, and parasitological threats. The full disciplinary distribution of publications is detailed in Table 1.

When analyzing international collaboration networks and national contributions, Türkiye's position in *Culicoides* research is noteworthy. In terms of publication count, Türkiye has a contribution rate of 2.759% with 8 articles, placing it behind countries such as the USA (28.276%), the UK (14.483%), and Germany (13.103%), but on par with countries like Ireland, Japan, and Scotland in terms of publication performance. However, when examining the collaboration map, Türkiye is seen to play a central role in the international co-author network. Its collaborations with countries with different geographical and scientific profiles, such as Spain, France, South Africa, Tunisia, Poland, and South Korea, have made Türkiye an important hub in the global *Culicoides* research ecosystem. This situation highlights Türkiye's strategic importance in the

field, not only through its quantitative contribution but also through its integration into interdisciplinary and multinational research networks (Table 2, Figure 2). The network map also shows that other important international partners, such as France, Germany, Türkiye, and India, are integrated into this global research ecosystem. Given the global threat of vector-borne pathogens associated with *Culicoides* (such as Bluetongue and African Horse Sickness), this structure reflects the transboundary nature of the issue and the vital importance of interdisciplinary collaboration for research progress in this field.

This bibliometric analysis reveals institutional productivity and collaboration networks in *Culicoides* research. Institutions such as the United States Department of Agriculture (USDA), the Florida State University System, and the UK-based Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC) stand out as the most productive organizations in the field, with publication rates of 8.3%, 7.9%, and 7.6%, respectively. Keyword analysis shows that research focuses are shaped around thematic clusters such as “DNA barcoding,” “vector control,” “Bluetongue virus,” and “host preference.” When examining geographical distribution, the US and European countries play a central role, but Türkiye, South Korea, and South Africa also make strong contributions. It is particularly noteworthy that Türkiye has become an important hub in the global research network with its studies on regional vector-borne pathogens. These findings demonstrate that *Culicoides* research has an interdisciplinary and multi-centered structure and that global collaborations are vital for progress in the field (Table 3, Figure 3). This bibliometric map demonstrates that *Culicoides* research has a multidimensional and interdisciplinary structure. Studies range from basic species identification to the epidemiology of vector-borne diseases and control strategies. Furthermore, global collaborations and regional focuses balance the universal and local dimensions of the research. This type of analysis provides a valuable guide for determining future research priorities and strengthening collaborations.

Scientific research conducted on *Culicoides* species is highly regarded in academic literature and largely published in prestigious international indexes due to the critical importance of these vectors in public health and veterinary medicine. Analyses conducted using the WoS database reveal that a remarkably high percentage (96.2%) of the articles examined were published in journals included in the Science Citation Index Expanded (SCI-Expanded). This dominant category is followed by other indexes such as the Emerging Sources Citation Index (ESCI) (3.8%) and the Conference Proceedings Citation Index–Science (CPCI-S) (1%). This distribution demonstrates that almost all scientific production related to *Culicoides* is concentrated in high-impact, peer-reviewed science and health science journals, clearly reflecting the importance given to the field (Table 4, Figure 4).

The analyzed bibliographic data revealed that the term *Culicoides* forms a central node in co-word analysis network maps and constitutes the fundamental axis of the research field in question. The keywords most frequently associated with “*Culicoides*” include pathogen and disease themes such as “vector,” “Bluetongue virus,” “bovine ephemeral fever,” “Schmallenberg virus,” and “Orbivirus.” These findings indicate that the research focus is predominantly focused on the epidemiology and transmission dynamics of vector-borne viral pathogens.

The network analysis also observed that geographical regions such as “Türkiye,” “Iran,” “Australia,” and “North America” form significant clustering areas. Keyword time trend analysis indicates a clear shift towards genetic and phylogenetic themes such as molecular identification, phylogeography, and species complexes after 2010. This trend indicates that the research paradigm in the field has evolved from morphological identification to molecular systematics.

This study systematically evaluates global trends, collaborations, and thematic focuses in *Culicoides* research using bibliometric analysis methods. The findings are expected to guide researchers, particularly those working in the fields of parasitology and veterinary entomology, in identifying gaps in the existing literature and planning future research directions. The data used in the study were obtained from the WoS database, which is widely accepted in bibliometric research. However, it should be noted that, as a limitation of the study, some studies included in other large databases such as Scopus or PubMed may not have been included in the analysis because it is based solely on the WoS index. This situation may limit the generalizability of the results, and the integrated use of multiple databases may be recommended in future studies. It is important to increase *Culicoides* research in our country and improve molecular methods for better epidemic control and diagnosis.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Idea/Concept: SE, MA
Supervision/Consultancy: SE, HY
Data Collection and/or Processing: SE, MA, MY
Analysis and/or Interpretation: SE, MA
Writing the Article: MA
Critical Review: HY

REFERENCES

- Afşar M, Yasul M, Özbek A, Elasan S (2025). Analysis of global trends of Crimean-Congo haemorrhagic fever scientific research. *Turk J Appl Sci Technol*, 6(2), 130-142.
- Afşar M, Yıldız R, Elasan S (2024). Global analysis of research on *Opisthorchis* infection caused by *Opisthorchis* spp. *Kocatepe Vet J*, 17(3), 214-220.
- Alırcı İD (2022). Bibliometric analysis of publications on vertebral osteomyelitis infections. *J Biotechnol Strateg Health Res*, 6(1), 58-63.
- Borkent A (2016). World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 1-130.
- Dahdi SA, Ben Abdelaziz A, Baroumi T et al. (2018). Bibliometry of biomedical scientific publications in Mauritania (Medline: 1992-2016). *Tunis Med*, 96(10-11), 834-843.
- Deniz A, Korkmaz C, Bedir H et al. (2023). Host preferences of vector *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae, *Culicoides* Latreille) species in Türkiye. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 29(1), 89-97.
- Dik B (1989). Investigations on *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) found in Konya and surrounding areas. *Ankara University Health Sciences Institute, Doktora Tezi*.
- Dik B (2017). *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) vectorial capacities and control. İçinde: Özbel Y (editör), *Vector Arthropods and Their Control*. *Türkiye Parazitol Derg*, İzmir, s.46-122.
- Durgun C (2021). Global publication trends in living donor liver transplantation and analysis of publications from Turkey. *J Biotechnol Strateg Health Res*, 5(3), 214-220.
- Elbers AR, Meiswinkel R, van Weezep E, van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM, Kooi EA (2013). Schmallenberg virus in *Culicoides*

- spp. biting midges, the Netherlands, 2011. *Emerg Infect Dis*, 19(1), 106-109.
- Harrup LE, Bellis GA, Balenghien T, Garros C (2015).** *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) taxonomy: current challenges and future directions. *Infect Genet Evol*, 30, 249-266.
- Kieffer JJ (1918).** Chironomides d'Afrique et d'Asie conservés au Musée National Hongrois de Budapest. *Ann Hist Nat Mus Nat Hung*, 16, 31-136.
- Korkmaz C, Alten B, Erol U, Deniz A (2021).** Updated checklist of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) species in Turkey with ten new records. *J Vector Ecol*, 46(1), 124-136.
- Maciver SK, Piñero JE, Lorenzo-Morales J (2020).** Is Naegleria fowleri an emerging parasite? *Trends Parasitol*, 36(1), 19-28.
- Turgut F, Küçük Ş (2022).** *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) of Sarıkum Nature Reserve Area (Sinop-Turkey). *Munis Entomol Zool*, 17(1), 286-300.
- Van Eck NJ, Waltman L (2022).** VOSviewer manual for VOSviewer version 1.6.20. Universiteit Leiden: CWTS.
- Yeşilöz H, Önder Z, Yıldırım A (2025).** Molecular characterization of *Culicoides* species in Turkey's Izmir region and their vector potential for Haemosporidia infections. *Turk J Parasitol*, 49(1), 35-44.
- Yıldız E (2022).** Bibliometric analysis of publications on pregnancy and anesthesia in Turkey. *BSJ Health Sci*, 5(1), 50-55.
- Yıldız R, Afşar M, Elasan S (2024).** Global trends in studies on the presence of *Demodex* species in patients diagnosed with blepharitis. *J Arthropod-Borne Dis*, 18(2), 84-95.



Evaluation of Immunohistochemical Expression of Collagen Type I and IV, Histopathological Changes, and Bacterial Isolates in Canine Pyometra

Behzat TEBRİZİ¹, * Nurdan KARACAN SEVER², Elif EKİNCİ¹, Simten YEŞİLMEN ALP², Mustafa ÖZKARACA³

¹ Dicle University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Diyarbakır, Türkiye

² Dicle University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Diyarbakır, Türkiye

³ Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Sivas, Türkiye

Received: 13.12.2025

Accepted: 17.07.2026

ABSTRACT

Pyometra is a widespread and possibly fatal reproductive disease in intact female dogs but its pathogenesis, and the processes involved in tissue repair after infection, are not fully explained. The aim of the study was to clarify possible pathogenetic processes by analyzing clinical, histopathological and immunohistochemical activity of Collagen I and Collagen IV as well as bacteriological results of 6 healthy and 12 dogs with pyometra. These findings were confirmed through histopathological analysis with the help of the hematoxylin and eosin (H&E) staining, which revealed the presence of severe cystic endometrial hyperplasia, neoangiogenesis, Neutrophil-predominant inflammation, moderate hemorrhage, accumulation of inflammatory cells in endometrial glands and the presence of necrotic foci in glandular epithelium in pyometra cases, but mild or absent in healthy controls. Collagen I and Collagen IV expression underwent mild to moderate expression in controls but a significant increase in pyometra group, which revealed a high rate of extracellular matrix remodeling. *Escherichia coli* was microbiologically isolated in all (100) and *Streptococcus* spp. in two (16.7) cases. The strains of *E. coli* were different in their levels of multidrug resistance. Finally, this study demonstrates that the nature of pyometra is characterized by severe inflammation and uterine degeneration, high collagen expression, and the prevalence of multidrug-resistant bacterial infections. The research findings add to the knowledge of the pyometra pathogenesis, the criticality of antimicrobial resistance, and provide a valuable source of information for the veterinary literature on the condition.

Keywords: Collagen, *Escherichia coli*, Immunohistochemistry, Pyometra, *Streptococcus* spp.

ÖZ

Köpek Pyometrasında Kollajen Tip I ve IV'ün İmmünohistokimyasal Ekspresyonu, Histopatolojik Değişiklikler ve Bakteriyel İzolatların Değerlendirilmesi

Piyometra, kısırlandırılmamış dişi köpeklerde yaygın ve muhtemelen ölümcül bir üreme hastalığıdır, ancak patogenezi ve enfeksiyon sonrası doku onarımında yer alan süreçler tam olarak açıklanmamıştır. Bu çalışmanın amacı, 6 sağlıklı ve 12 pyometra hastası köpeğin klinik, histopatolojik ve Kollajen I ve Kollajen IV'ün immünohistokimyasal aktivitesinin yanı sıra bakteriyolojik sonuçlarını analiz ederek olası patogenetik süreçleri açıklığa kavuşturmak. Bu bulgular, hematoksilin ve eozin (H&E) boyaması yardımıyla yapılan histopatolojik analizle doğrulandı; bu analiz, pyometra vakalarında şiddetli kistik endometrial hiperplazi, neovaskülarizasyon, nötrofilden baskın inflamasyon, orta derecede kanama, endometrial bezlerde inflamatuvar hücre birikimi ve bez epitelyumunda nekrotik odakların varlığını ortaya koyarken, sağlıklı kontrollerde hafif veya yok denecek kadar azdı. Kollajen I ve Kollajen IV ekspresyonu kontrollerde hafif ila orta düzeyde iken, pyometra grubunda önemli bir artış gösterdi ve bu da yüksek oranda hücre dışı matris yeniden şekillenmesini ortaya koydu. *Escherichia coli* tüm vakalarda (100) ve *Streptococcus* spp. iki vakada (16,7) mikrobiyolojik olarak izole edildi. *E. coli* suşları, çoklu ilaç direnci düzeyleri bakımından farklılık gösterdi. Son olarak, bu çalışma, piyometranın doğasının şiddetli inflamasyon ve uterus dejenerasyonu, yüksek kollajen ekspresyonu ve çoklu ilaç dirençli bakteriyel enfeksiyonların yaygınlığını göstermektedir. Araştırma bulguları; piyometra patogenezi, antimikrobiyal direncin kritikliği hakkındaki bilgilere katkıda bulunmakta ve veteriner literatüründe bu durumla ilgili son derece değerli bir bilgi kaynağı haline gelmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kollajen, *Escherichia coli*, İmmünohistokimya, Piyometra, *Streptococcus* spp.

INTRODUCTION

Pyometra is a common, life-threatening condition that affects the female reproductive tract in intact female dogs (Xavier et al. 2023). The condition is known to occur

during the luteal phase, when progesterization dominates the exclusion of the host defense mechanisms of the uterus, thus contributing to the facilitation of bacterial ascend, colonization, and infection. Pyometra is marked by

*Corresponding author: behzad.mokhtare@dicle.edu.tr



the presence of a yellow to green pus within the uterine lumens, which is, at times, accompanied by the presence of systemic toxicity (Chitra 2025). For instance, the condition is attributed to several symptoms such as polydipsia, polyuria, vaginitis, lethargy, anorexia, vomiting, and pyrexia. In addition, failure to treat the condition leads to life-threatening conditions such as peritonitis, sepsis, endotoxemia, and multiple organ dysfunction syndrome (Kutzler 2019).

The diagnosis of pyometra is made on the basis of a thorough assessment of the patient's anamnestic data, clinical manifestations, and findings from vaginal, cytopathological, hematological, and biochemical tests. Among imaging techniques, ultrasonography is investigated as a characteristic technique that provides evidence of fluid accumulation within the uterine lumen. But, for a precise diagnosis, histopathological analysis of the ovary-hysterectomized uterine tissue, together with bacteriological evaluation of uterine fluid, is essential (Lansubsakul et al. 2022). Early detection, combined with a prompt determination of the etiological agents, particularly susceptibility to available antimicrobial agents, plays a pivotal role in preventing life-threatening conditions. Bacterial cultures and susceptibility testing, preferably before treatment, is highly desirable. This helps in identifying potential selective antimicrobial agents, which, when used in adequate doses, would increase treatment successes, reduce the recovery periods, apart from helping curb the ongoing problem of increased antimicrobial resistance among common agents of pyometra-causing bacteria in canine species (Paudel 2023).

On the basis of histopathological findings, cystic endometrial hyperplasia (CEH) is identified as one of the most characteristic and evident changes observed in pyometra, with varied severity. CEH has been identified as a common pathologic change, especially in closed-cervix pyometra, with a large number of researchers identifying the significant association of endometrial hyperplasia with the development of the condition. In pyometra, acute hemorrhage within the endometrium of varied intensity has been identified, in addition to which, in certain cases, extravasation of erythrocytes within the layers of endometrium has been identified. Infiltration with a large number of inflammatory cells is identified as the next characteristic of pyometra. Neutrophils are identified as the predominant population of cells, which are in association with plasma cells, lymphocytes, and macrophages, with a large amount of dispersion within the stroma, glandular epithelium, as well as within the lumina of the glands in certain cases (Woźna-Wysocka et al. 2021; Gogoi et al. 2022).

Another major element within the pyometra pathogenesis is the marked vascular changes that occur within the uterine tissue. Immunohistochemistry has revealed a profound increase in the vascularity of the uterus with pyometra when compared with the healthy uterus. High expression of angiogenic indices has been linked with hemodynamic changes such as increased flow and reduced vascular resistance. From the later progressive phases of pyometra (especially in cases of very virulent bacterial infections) there have been described very pronounced pathologic alterations including endometrium necrosis and ulcers. (Quartuccio et al. 2020). Collagen types I and IV are among the most important structural collagens of the canine uterus" more suitable. One of the key fibrous elements of the stromal portion of the extracellular matrix is type I collagen and the other important component of

the basement membrane is type IV collagen. Despite a small number of studies regarding the expression profile of types I and IV collagen in pyometra, it is possible to refer to research results on the remodeling of the uterus, chronic inflammation, and infectious endometritis, indicating that imbalance in collagen metabolism is a major cause of the structural changes in this condition (Oefner et al. 2015; Paping et al. 2023).

It is also known that Type I collagen is vital in the maintenance of the structure of stroma, and it also participates in tissue repair. The accumulation of Type I collagen, often with a disruption in the collagen I/III ratio, is generally accepted as a marker characteristic for fibrosis and scarring of the uterus, resulting from various pathologies. This evidence clearly states that inflammatory infections in the uterus stimulate a notable increase in the production of Type I collagen, which takes place within the mechanisms of repair (Paping et al. 2023). In a similar way, Type IV collagen, a component with a fundamental role in the structure of the basement membrane, is dynamically adjusted within the uterus during both physiological and pathological conditions. Its expression has been documented to increase with hormonal stimuli, alongside inflammation, simultaneously influencing the structure of the respective tissue, together with interactions of the epithelium with the stroma, cellular adhesion, as well as cellular migration a phenomenon clearly pronounced during tissue damage, such as that taking place in pyometra (Oefner et al. 2015).

In bacteriological terms, *Escherichia coli* (*E. coli*) is considered a major pathogen, while *Streptococcus* spp. are considered secondary, in cases of pyometra in canines. The extra-intestinal pathogenic *E. coli*, especially the B2 phylogeny, has a significant potential for ascending infection into the reproductive tract, leading to colonization of the uterus, thus increased severity of the disease (Xavier et al. 2024). The pathogen's virulence mainly depends on their potential to adhere to the endometrial surface, invade the uterine tissue, escape the host's immune system, and form a protective biofilm (Lopes et al. 2021). The biofilm, composed of an extrapolymeric substance, shields the bacteria from the host's immune response as well as antimicrobial agents, hence contributing to treatment failure. Additionally, genetic similarity has been revealed, via molecular characterization, within *E. coli* strains obtained from pyometra infections, which are linked to existing urogenital infections in many cases, thereby supporting the theory that the infection originates from the urogenital tract (Melo et al. 2022).

Although *Escherichia coli* is the most commonly identified bacteria in cases of pyometra in canines, *Streptococcus* spp, such as *Streptococcus canis* (*S. canis*), *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*), and *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*), also have a notable role in the development of the disease. The Gram-positive bacteria are generally recognized as a secondary pathogen in a polymicrobial infection, but the pathogenic severity is assumed to be limited in pyometra compared to that of *E. coli* (Lopes et al. 2021). Nonetheless, the following virulence factors produced by *Streptococcus* spp, such as streptolysin, hyaluronidase, and streptokinase, are capable of causing damage to the endometrium, enhancing local inflammation, and, moreover, progressing towards systemic infection dissemination of the pathogen in the later stages. Furthermore, it has been identified that the bacteria tend to form a synergistic relationship with Gram-negative bacteria such as *E. coli*, hence extending

endometrial damage and, moreover, setting a premise for systemic endotoxin-mediated inflammatory response syndrome (SIRS) development (Xavier et al. 2023). In summary, although the high potential for biofilm formation, several virulence factors, as well as rising resistance mechanisms against antimicrobial agents of *E. coli* make way for a predominant causative agent in pyometra, *Streptococcus* spp. mainly tend to serve as opportunistic copathogens (Lopes et al. 2021). Hence, in order to provide a sound treatment against pyometra, it is essential that an antibiotic treatment plan is introduced predominantly taking into consideration the biological properties and resistance mechanisms of *E. coli*.

The aim of this study is to comprehensively analyze type I and type IV collagen expression in dogs with pyometra and to characterize the types of bacteria found in the uterus in detail. Furthermore, by evaluating structural changes in the extracellular matrix together with bacterial virulence characteristics, the study aims to elucidate the relationship between tissue changes and microbial factors playing a role in the pathogenesis of pyometra.

MATERIAL AND METHODS

Materials

The pyometra-affected uteri of the present study were obtained during the ovariohysterectomy or necropsy of dogs aged 4-15 years and weighing 7-21kg and came by different provinces in a period of two years. There were 18 uteri (6 healthy and 12 pyometra uteri) that were checked (Alshrari et al. 2023). In this study, the official statement of the Dicle University Local Ethics Committee dated 30.10.2025 (Decision No. 01) was requested, which means that this study is not subject to HADYEK ethical approval.

Histopathology Method

The initial fixation of tissue samples was done using 10% formalin and after that, the samples were processed using the standard histological procedures in the Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine Dicle University. A Leica RM2125 RTS microtome was used to prepare sections of 4 µm thickness which were stained with hematoxylin and eosin (H & E). The slides were viewed under a Bioblue 1153-PLI light microscope and the evaluation of histopathological changes was performed using a semi-quantitative scoring system with lesions being classified as negative (0), mild (1), moderate (2), or severe (3) (Keleş et al. 2024).

Immunohistochemical Method

The 4-m thick paraffin-embedded sections were placed on poly-L-lysine-treated slides and allowed to be deparaffinized by placing them in xylene and rehydrated by means of progressive alcohol series. Phosphate-buffered saline (PBS) was used to rinse the sections, and 3% hydrogen peroxide (H₂O₂) was applied to the sections, which were allowed to stand after 10 minutes to inhibit endogenous peroxidase activity. The tissues were subjected to antigen retrieval solution in the microwave oven at 500 W where it was warmed twice at 5 minutes each time. Upon the cooling down, the sections were washed once more in PBS and the samples were incubated overnight at +4 °C with the primary antibodies Collagen I (AF0134) and Collagen IV (AF0510) at a 1: 200 dilution. The primary antibody was incubated followed by the processing of the sections as per instructions of Large Volume Detection System: anti-Polyvalent, HRP (ThermoFisher, Catalog No: TP-125-HL). 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) was used as the chromogen and

counterstaining done with Mayer hematoxylin stain. Immunohistochemical staining was assessed semi-quantitatively under light microscopy. For each tissue section, six randomly selected, non-overlapping microscopic fields were examined at ×20 magnification. The staining intensity and distribution of immunopositive cells were evaluated, and immunoreactivity was scored as negative (0), mild (1), moderate (2), or severe (3). The scores obtained from the six microscopic fields were used for the final evaluation of each sample (Keleş et al. 2024).

Bacteriological Isolation and Identification

The content and tissue samples of the uterus were transported to the Microbiology Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, Dicle University in cold-chain conditions. Direct inoculation was performed on the 7% sheep blood agar (Oxoid, USA), MacConkey agar (Oxoid, USA) and eosin methylene blue agar (Oxoid, USA). The plates were inoculated and incubated aerobically at 37 °C between 24 and 48 hours. After incubation, well-isolated bacterial colonies from the primary culture media were subcultured onto nutrient agar (Oxoid, USA) to obtain pure isolates for subsequent identification. The microscopic morphology was determined by Gram staining. The identification of bacterial strains to genus and species was done through conventional biochemical tests, such as hemolysis pattern, catalase, oxidase, oxidation-fermentation, lactose fermentation, indole production, methyl red-voges-Proskauer, citrate utilization, urease activity, and triple sugar iron agar reactions (Ylhäinen et al. 2025).

Antimicrobial Susceptibility Testing

Antimicrobial susceptibility of the strains was determined by the Kirby-Bauer disk diffusion method in accordance with Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (CLSI, 2018; CLSI, 2020). The following antibiotic disks (Bioanalyse, Türkiye) were tested: ampicillin (10 µg), ceftriaxone (30 µg), cefoxitin (30 µg), gentamicin (10 µg), ciprofloxacin (5 µg), enrofloxacin (5 µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg), doxycycline (30 µg), erythromycin (15 µg), and vancomycin (30 µg). After 18–24 hours of incubation, zone diameters were measured and interpreted as susceptible, intermediate, or resistant according to the corresponding CLSI reference standards. Strains exhibiting resistance to at least one agent in three or more antimicrobial classes were classified as multidrug-resistant (MDR) strains (Schwarz et al. 2010).

Statistical Analysis

Data was analyzed using IBM SPSS Statistics version 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Since the number of samples examined in the study was less than 30, a non-parametric test, the Mann-Whitney U test for two independent samples, was used to determine whether there was a statistically significant difference between the groups. P values less than 0.05 were considered statistically significant (Keleş et al. 2024). The statistical power of the study was assessed by post-hoc analysis using the G*Power software (v3.1.9.7), which is commonly used in the biomedical field. Although the Mann-Whitney U test was employed to compare the differences between two independent groups, the statistical power of the study was calculated using the parametric equivalent approach of the independent samples t-test. On the basis of the current sample size (n = 18; control = 6, pyometra = 12), the statistical power of the study was found to be more than 95% on the basis of the current effect size (Kang 2021).

RESULTS

Macroscopic Findings

Macroscopically, uteri from pyometra cases exhibited marked distension and a loss of normal morphology. The uterine lumen was entirely filled with a viscous, purulent material ranging in color from yellow to dark green. In the affected animals, the uterine wall was noticeably thickened, and pronounced areas of hyperemia and vascular congestion were particularly evident near the serosal surface. In addition, in several cases, the uterine surface showed a swollen appearance accompanied by tissue tension (Figure 1).

Histopathological Findings

In healthy uteri, glandular hyperplasia, neoangiogenesis, hemorrhagic areas, luminal inflammatory cells, and epithelial necrosis were observed at a negative level, while inflammatory cell infiltration was observed at a mild level. In uteri affected by pyometra, severe endometrial hyperplasia, neoangiogenesis, and inflammatory cell infiltration were detected. In parallel with these findings, hemorrhagic areas, luminal inflammatory cells, and epithelial necrosis were found to be at a moderate level in pyometra cases. In inflammatory cell infiltration, the inflammatory cells were predominantly neutrophils (Figure 2). Data are summarized as negative (0), mild (1), moderate (2), or severe (3) (Table 1).

Statistically significant differences were found between groups in endometrial gland hyperplasia, neovascularization, hemorrhagic areas, neutrophil-predominant inflammatory cell infiltration, neutrophil accumulation within gland lumens, and necrotic foci in the endometrial gland epithelium (Table 2).

Immunohistochemical Findings

Immunohistochemical analysis revealed mild Collagen I expression in the control group, whereas severe expression was observed in the pyometra groups. Similarly, Collagen IV expression was moderate in the control group but severe in the pyometra groups (Figure 3). Furthermore, the data scoring is summarized (Table 3).

Statistically significant differences were detected between the control and pyometra groups in the immunohistochemical staining intensity of both Collagen I and Collagen IV (Table 4).

Bacteriological Findings

A total of 12 uterine content samples were examined. *Escherichia coli* was isolated and identified from all samples (100%). In two cases (16.67%), *Streptococcus* spp. were isolated together with *E. coli*. All *E. coli* strains (100%) were resistant to enrofloxacin. Seven strains (58.33%) exhibited resistance to both ampicillin and ciprofloxacin (Table 5). All *E. coli* strains (100%) were susceptible to ceftiofur, and 83.33% were susceptible to cefoxitin. Five *E. coli* strains (41.67%) were classified as multidrug-resistant (MDR). Regarding *Streptococcus* spp. strains, 50% showed resistance to ampicillin, enrofloxacin, and ciprofloxacin. All *Streptococcus* spp. strains were susceptible to doxycycline, gentamicin, vancomycin, and erythromycin (Table 5). No multidrug resistance was detected among *Streptococcus* spp. strains.

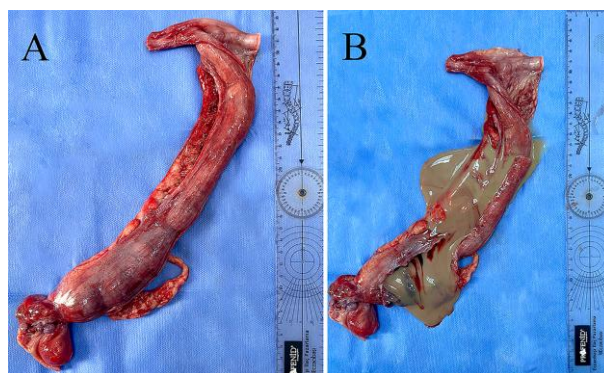


Figure 1: (A) Uterus with closed pyometra; (B) uterine lumen that is severely distended and thickened, filled with a yellow-green purulent exudate.

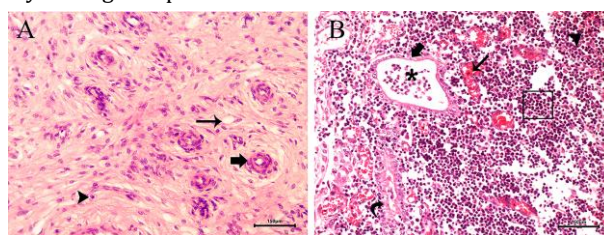


Figure 2: (A) Normal vascular structure (thin arrow), normal endometrial gland (thick arrow), and neutrophils among inflammatory cells (arrowhead). (B) Endometrial gland hyperplasia (thick arrow), neoangiogenesis (thin arrow), hemorrhagic area (arrowhead), inflammatory cell infiltration composed of neutrophils (square), neutrophil aggregates within the endometrial gland lumen (asterisk), and necrotic foci in the endometrial gland epithelium (round arrow). Hematoxylin and Eosin, (X20, Bar: 150 μ m).

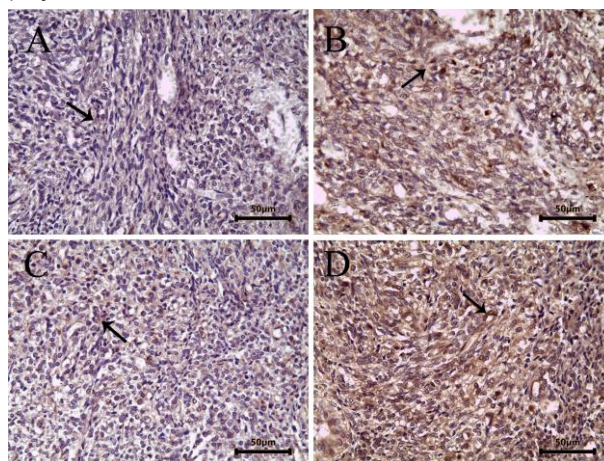


Figure 3: (A) Control group, mild Collagen I expression; (B) Pyometra group, severe Collagen I expression (thin arrow); (C) Control group, moderate Collagen IV expression; (D) Pyometra group, severe Collagen IV expression (thin arrow). Immunohistochemical staining with hematoxylin counterstaining (X20, Bar: 50 μ m).

Table 1: Scoring of histopathological findings observed in uterine tissues using H&E staining, negative (0), mild (1), moderate (2), and severe (3).

Groups	Control	Pyometra
Glandular Hyperplasia	0	3
Neoangiogenesis	0	3
Hemorrhagic Areas	0	2
Inflammatory Cell Infiltration	1	3
Luminal Inflammatory Cells	0	2
Epithelial Necrosis	0	2

Table 2: Data were compared statistically within their respective groups, and different letters indicate significant differences between groups (a, b; $p < 0.05$).

	n	Minimum	Maximum	Mean $\pm$ SD	p
Glandular Hyperplasia	12	41,0	85,5	62,33 $\pm$ 14,85	0,001*
Control	6	0,00	13,00	3,66 $\pm$ 5,81	
Neoangiogenesis	12	51,00	88,00	71,41 $\pm$ 12,28	0,001*
Control	6	0,00	35,00	10,83 $\pm$ 16,85	
Hemorrhagic Areas	12	35,00	88,00	53,33 $\pm$ 17,40	0,001*
Control	6	0,00	28,00	4,66 $\pm$ 11,43	
Inflammatory Cell Infiltration	12	29,00	86,00	67,75 $\pm$ 17,06	0,001*
Control	6	0,00	2,00	0,66 $\pm$ 0,81	
Luminal Inflammatory Cells	12	21,00	91,00	46,50 $\pm$ 13,95	0,002*
Control	6	0,00	26,00	6,33 $\pm$ 10,76	
Epithelial Necrosis	12	28,00	86,00	50,33 $\pm$ 19,49	0,001*
Control	6	0,00	18,00	3,00 $\pm$ 7,34	

Table 3: Scoring of findings observed in uterine tissues using immunohistochemistry staining, negative (0), mild (1), moderate (2), and severe (3).

Groups	Control	Pyometra
Collagen I	1	3
Collagen IV	2	3

Table 4: Statistical comparison of data within their groups revealed that there was a significant difference between groups with different letters. (a, b $p < 0.05$).

	n	Minimum	Maximum	Mean $\pm$ SD	p
Collagen I	6	22,00	38,00	30,33 $\pm$ 6,02	0,001*
Control	12	45,00	86,00	62,83 $\pm$ 15,17	
Collagen IV	6	22,00	61,00	44,83 $\pm$ 13,58	0,011*
Control	12	30,00	90,00	68,50 $\pm$ 17,52	

Table 5: Antibiotic susceptibilities of *E. coli* and *Streptococcus* spp. strains isolated from uterine contents. S: Susceptible, I: Intermediate, R: Resistant, n (%).

Antibiotic Class	Antibiotic	<i>E. coli</i>			<i>Streptococcus</i> spp.		
		S	I	R	S	I	R
Penicillin	Ampicillin	5 (41.67)	0	7 (58.33)	1 (50)	0	1 (50)
Cephalosporin	Cefoxitin	10 (83.33)	2 (16.67)	0	2	0	0
	Ceftriaxone	12 (100)	0	0	2	0	0
Fluoroquinolone	Enrofloxacin	0	0	12 (100)	0	1 (50)	1 (50)
	Ciprofloxacin	3 (25)	2 (16.67)	7 (58.33)	1 (50)	0	1 (50)
Tetracycline	Doxycycline	6 (50)	0	6 (50)	2 (100)	0	0
Sulfonamide	Trimethoprim/sulfamethoxazole	3 (25)	3 (25)	6 (50)	1 (50)	1 (50)	0
Aminoglycoside	Gentamicin	6 (41.67)	1 (8.33)	4 (50)	2 (100)	0	0
Glycopeptide	Vancomycin	-	-	-	2 (100)	0	0
Macrolide	Erythromycin	-	-	-	2 (100)	0	0

DISCUSSION AND CONCLUSION

The study, through comparative histopathological and immunohistochemical evaluation of healthy and pyometra-affected uteri, illustrated well the structural changes induced by pyometra pathogenesis at the tissue level. The results have shown that inflammation, glandular hyperplasia, and the remodeling of the ECM actually run side by side during the development of pyometra. The study on the expression of collagen I and IV and the isolation of agents involved in pyometra-affected tissue have shed much light on the tissue dynamics of the disease.

As shown by Quartuccio et al. (2020), while minimal endometrial gland hyperplasia and angiogenesis are normal physiological features in healthy uteri, in this study

these changes were significantly concentrated in uteri affected by pyometra (Quartuccio et al. 2020). Such findings evidence that hormonal disturbances have an important impact on the disease's pathogenesis. Indeed, increased levels of progesterone and alterations in the estrogen-progesterone cycle enhance sensitivity of the uterus to these hormones, which results in marked proliferation and increased secretion of endometrial glands. These structural changes, coupled with bacterial colonization and the subsequent inflammatory response, facilitate the development of the disease (Sugiura et al. 2004).

Tissue-level structural changes caused by pyometra were studied using histopathological and immunohistochemical comparisons of healthy and pyometra-affected uteruses in various studies (Woźna-Wysocka et al. 2021; Xavier et al.

2024). Increased endometrial thickness, cystic endometrial hyperplasia, a clear inflammatory cell infiltration both in glandular regions and in areas of stromal region, fibrosis, adenomyosis, and endometrial hemorrhage were reported in pyometra-affected uteruses (Woźna-Wysocka et al. 2021). Similarly, in this study, endometrial gland hyperplasia, neoangiogenesis, hemorrhage, inflammatory cell infiltration, the accumulation of inflammatory cells in the glandular lumen, and necrosis of epithelial cells were described and demonstrated in endometrial glands in agreement with the literature. The presence of a small number of inflammatory cells in the control group should not be interpreted as evidence of pathological inflammation. A healthy endometrium may contain a normally low number of leukocytes associated with physiological immunity and the estrous cycle, the distribution of which varies depending on the phase of the estrous cycle. These inflammatory cells contribute to uterine homeostasis and defense against upwardly advancing microorganisms (Pascottini et al. 2023).

The well-recognized condition of endometrial glandular hyperplasia developing under the influence of progesterone creates a very suitable environment for bacterial colonization (Hagman 2018). In this study, the marked angiogenesis observed in the pyometra-affected uteri was interpreted as indicative of the vascular remodelling process that had been triggered by the inflammatory response.

Although there have been many histopathological and immunohistochemical studies comparing pyometra-affected and healthy uteri in the literature, our systematic review did not identify specific findings regarding hemorrhagic areas in pyometra-affected uteri. In contrast, the present study detected distinctly moderate hemorrhagic regions in pyometra cases. This observation suggests that local diapedesis hemorrhage may occur as a result of inflammatory response-induced vascular wall damage and increased vascular permeability. In this context, the disruption of vascular integrity and enhancement of vascular permeability at the tissue level should be considered among the key morphological alterations contributing to the pathogenesis of pyometra. In cases of pyometra, Xavier et al. (2024) indicated that there is acute inflammatory infiltration of the uteri, with neutrophils being the main cell type present. This is further accompanied by changes such as necrosis of the endometrium, disruption of glandular architecture, and edema. Such findings confirm the acute and suppurative nature of this disease and reveal the severity of the damage to the endometrial structure is. In the current study, also, severe neutrophil-dominant inflammatory infiltration, foci of endometrial necrosis, and disruptions in glandular architecture were determined in the cases of pyometra, which also confirmed the acute and suppurative nature of pyometra in accordance with the findings of Xavier and colleagues (Xavier et al. 2024).

In our study, the epithelium of uteri affected by pyometra demonstrated moderate necrotic foci and glandular deformities. These results indicate that the epithelial integrity is disrupted due to inflammation and possible bacterial toxins, which could therefore suppress the process of tissue regeneration. Moreover, simultaneous necrosis and structural decline in the endometrial glands reflect the progressive features of the disease and the degree of mucosa lesion. While it has been documented in the literature that glandular degeneration, inflammation, and endometrial deformation can be present in the case of

pyometra, the studies of Ali et al. (2023), Woźna-Wysocka et al. (2021), and De Bosschere et al. (2001), comparative studies regarding epithelial necrosis in healthy uteruses are few in number, and the data regarding this subject are not sufficient. In such a context, the outcomes of the present study suggest that inflammation-mediated tissue injury and rupture of the integrity of the mucous are the main parts of the pathological process in pyometra. The results represent that the necrotic feature of pyometra pathogenesis should also be emphasized along with the proliferative feature (De Bosschere et al. 2001; Woźna-Wysocka et al. 2021; Ali et al. 2023).

The immunohistochemical findings strongly support the impact of pyometra pathogenesis on the components of the ECM. The transition of Collagen I expression, from mild in the control group to markedly intense in the uteri affected by pyometra, indicates ECM remodeling associated with an increase in fibroblast activity, enhanced stromal fibrotic responses, and activation of chronic inflammatory processes. It correlates well with the literature, in which collagen deposition is assigned to being among the characteristics of chronic inflammation and tissue repair. As an example, Sen et al. (2025) reported that collagen-based products support the increase of fibroblasts and regulation of the infiltration stage of chronic wounds to minimize the possibility of fibrosis (Sen et al. 2025). In the same spirit, Birca et al. (2025) emphasized that the enhancement of collagen hydrogels with nanoparticles can stimulate the remodeling of the ECM in chronic inflammation because of its ability to enhance angiogenesis and fibroplasia (Birca et al. 2025). Furthermore, in models of chronic uterine inflammation such as pyometra, augmented Collagen I expression was found to activate transdifferentiation of fibroblast-myofibroblast and overabundant deposition of the ECM, which in turn are amplified by various profibrotic cytokines, such as TGF-1 and IL-13 (Gillesberg et al. 2025). The increase in collagen I detected in these studies is correlated with its strong expression in our immunohistochemical studies, suggesting that stromal hardening and loss of tissue integrity are hallmarks of the fibrotic phase in pyometra.

The enhanced amount of Collagen IV, thus, indicates a significant basement membrane remodeling and thickening (Liu et al. 2022). Though moderate in the control group, the expression has attained a drastic level in the pyometra group and therefore reflects an increased damage regeneration cycle in the glandular structures and basal lamina integrity perturbation. This has been found to aid the inflammatory cells to penetrate as it helped in the remodeling of basement membranes and interactions between the epithelial cells and stroma in uterine fibrosis and chronic endometritis models (Tanaka et al. 2009). Furthermore, the accumulation of Collagen IV, which is associated with the imbalance of the action of the matrix metalloproteinases, including MMP-2 and MMP-9, during the pyometra pathogenesis, encourages the chronic epithelial damage and fibrotic reactions, thereby contributing to the disease progression (Min et al. 2017; Feng et al. 2021). Altogether, the Collagen I and IV expressions are increased indicating a chronic inflammatory character of pyometra and its potential complications with fibrosis, and thus would imply ECM-stimulating therapeutic strategies, such as MMP-inhibitors or anti-TGF-B, to treat the disease.

To summarize, the histopathological and immunohistochemical findings are suggestive that pyometra causes not only a significant inflammatory

reaction in the uterine tissue but also is a progressive disorder that causes significant changes to the uterine histology. Pyometra is characterized by grossly enlarged endometrial glands, increased fibrotic reaction in the stromal compartment, and vascular structures with a high level of remodeling. This elevation in the Collagen I and IV levels indicate that the extracellular matrix is actively restructured during the pathogenesis of the disease and that remodeling is a major aspect of the cellular response to chronic inflammation.

Bacteriological analysis of the present study indicated that *Escherichia coli* was isolated from all 12 samples of the pyometra-affected uterus (100%), which has been entirely corroborated by the existing literature, identifying *E. coli* as the predominant pathogen of pyometra (Hagman 2022; Jitpean et al. (2014). Recent regional reports generally indicate *E. coli* isolation rates ranging from 60% to 90% in pyometra cases. The detection of *E. coli* in all samples in this study therefore strongly supports its central role in the etiopathogenesis of the disease. The co-isolation of *Streptococcus* spp. in two samples (16.67%) further indicates that while streptococci are less frequently detected, they can still play clinically relevant secondary roles in pyometra. Isolation rates usually range between 10% and 25% in reports regarding this microorganism (Hagman 2022; Xavier et al. 2023). The findings in the current study were within this expected range, thus suggesting that *Streptococcus* spp. often act as secondary opportunistic pathogens in the condition. In the present study, the detection that all strains of *E. coli* were resistant to enrofloxacin (100%) is in agreement with the rising tendency of fluoroquinolone resistance found in both Türkiye and other countries worldwide during the last years (Dalhoff 2012; Şahin and Altan 2019; Ruiz-Lievano et al. 2024). Likewise, in concordance with Paudel's findings (2023), 58.33% of the strains developed resistance against the antibiotic agents of ampicillin and ciprofloxacin, showing that penicillins and second-generation fluoroquinolones are getting progressively less reliable as pyometra empirical treatment options (Paudel 2023). On the other hand, all the *E. coli* strains in our study showed susceptibility to ceftriaxone (100%), and the majority for cefoxitin (83.33%), so third-generation cephalosporins are remaining effective therapeutic choices. Previous studies showed similarly very good rates of susceptibility to cephalosporins of strains isolated from canine pyometra (Fernandes et al. 2022; Hagman 2022). However, factors such as the necessity for frequent parenteral administration and higher cost often make clinicians turn to more practical alternatives, such as amoxicillin-clavulanic acid or cephalixin, as first-line choices in routine veterinary practice.

In the present study, 41.67% of the *Escherichia coli* strains were classified as MDR, defined as resistance to ≥ 3 antimicrobial classes. This finding suggests that antimicrobial resistance constitutes an important concern in pyometra. Given that MDR rates reported from Türkiye range from 35–60% (Kandir and Öztürk 2022; Şamhoğlu and Kılıç 2023), the MDR proportion observed in this study seems compatible with the regional data. The MDR strains can be linked to the severity of the disease because of the stimulation of sustained uterine infection, biofilm formation, and the long period of inflammation (Paudel 2023). These findings reiterate the need to incorporate culture and AST in clinical management of pyometra. In the current study, the MDR phenotype could not be detected in any strain of *Streptococcus* spp., and all of them were susceptible to doxycycline, gentamicin, vancomycin,

and erythromycin. This trend is associated with the literature demonstrating that streptococci typically have a more predictable and less resistant profile (Pretzer 2008; Xavier et al. 2023). Nevertheless, the presence of ampicillin and fluoroquinolone resistance in half of them suggests that although they are secondary pathogens, caution still should be exercised when making a choice of an antimicrobial in this group (Şababoğlu et al. 2021).

The finding that all cases harbored *E. coli* indicates, unequivocally, the significance of this organism as a principal cause of canine pyometra. In addition, high resistance levels towards commonly used antimicrobials including enrofloxacin, ciprofloxacin and ampicillin indicate that empirical treatment strategies which are commonly used in field conditions have a potential risk to be compromised. As for *Streptococcus* spp., although the resistance in most agents was low as a whole, it appears to be important to consider changes of these antimicrobials to select empirical therapy on account of resistant-infections.

In conclusion, the findings of this study demonstrate that pyometra in dogs is a multifactorial disease involving a triple and interactive combination of bacterial infection, antimicrobial resistance, and impaired tissue remodeling. The predominance of *E. coli* as the main pathogen and the associated patterns highlight the need for culture-based diagnosis and targeted antimicrobial therapy. Furthermore, the histopathological changes observed in uterine tissues demonstrate the need for a combined diagnostic and treatment strategy encompassing both microbiological and pathological factors for this disease.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENT

This research was financially supported by the Scientific Research Council of Dicle University (Project No: VETERİNER.22.004). The authors sincerely thank the Scientific Research Projects Coordination Unit of Dicle University (BAP) for its support

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Idea/Concept: BT
Supervision/Consultancy: SYA, EE, MÖ
Data Collection and/or Processing: BT, NKS
Analysis and/or Interpretation: BT, NKS, SYA
Writing the Article: BT
Critical Review: BT, MÖ, NKS, SYA

REFERENCES

- Ali OJ, Hassan AH, Saeed NM, Ali TG (2023). Pyometra in Dogs, Clinical, Bacteriological and Histopathological Observations. *Pak Vet J*, 43(4), 643–650.
- Alshrari AS, Hudu SA, Elmgdadi F, Imran M (2023). The urgent threat of *Clostridioides difficile* infection: A glimpse of the drugs of the future, with related patents and prospects. *Biomedicine*, 11(2), 426.
- Bircă AC, Minculescu MA, Niculescu AG et al. (2025). Nanoparticle-Enhanced Collagen Hydrogels for Chronic Wound Management. *J Funct Biomater*, 16(3), 91.
- Chitra P (2025). Microbiological and Haemato-biochemical Studies in Canine Pyometra. *Indian J Anim Res*, 59(9), 1559–1564.
- Dalhoff A (2012). Global fluoroquinolone resistance epidemiology and implications for clinical use. *Interdiscip. Perspect Infect Dis*, 2012(1), 976273.

- De Bosschere H, Ducatelle R, Vermeirsch H, Van Den Broeck W, Coryn M (2001).** Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected?. *Theriogenology*, 55(7), 1509-1519.
- Feng Y, Chen X, Wang H et al. (2021).** Collagen I induces preeclampsia-like symptoms by suppressing proliferation and invasion of trophoblasts. *Front Endocrinol*, 12, 664766.
- Fernandes V, Cunha E, Nunes T et al. (2022).** Antimicrobial Resistance of Clinical and Commensal *Escherichia coli* Canine Isolates: Profile Characterization and Comparison of Antimicrobial Susceptibility Results According to Different Guidelines. *Vet Sci*, 9(6), 284-285.
- Gillesberg FS, Pehrsson M, Bay-Jensen AC et al. (2025).** Regulation of fibronectin and collagens type I, III and VI by TNF- α , TGF- β , IL-13, and tofacitinib. *Sci Rep*, 15(1), 1087.
- Gogoi J, Leela V, Suganya G et al. (2022).** Detailed Pathophysiological Investigation of Canine Pyometra and the Curative Role of Ovariohysterectomy. *Indian J Anim Res*, 56(6), 742-747.
- Hagman R (2018).** Pyometra in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 48(4), 639-661.
- Hagman R (2022).** Pyometra in small animals 2.0. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 52(3), 631-657.
- Jitpean S, Ström-Holst B, Emanuelson U et al. (2014).** Outcome of pyometra in female dogs and predictors of peritonitis and prolonged postoperative hospitalization in surgically treated cases. *BMC Vet Res*, 10(1), 6.
- Kandir H, Öztürk D (2022).** Antimicrobial resistance of *E. coli* and *Salmonella* isolated from wild birds in a Rehabilitation Center in Turkey. *Arch Razi Inst*, 77(1), 257.
- Kang H (2021).** Sample size determination and power analysis using the G* Power software. *J Educ Eval Health Prof*, 18.
- Keleş ÖF, Huyut Z, Arslan M et al. (2024).** Antitumor activity of *Urtica dioica* seed extract on diethylnitrosamine-induced liver carcinogenesis in rats. *IJB*, 61(1), 16-31.
- Kutzler M (2019).** Reproductive microbiome alterations: canine pyometra. *Clin Theriogenology*, 11(4), 639-648.
- Lansubsakul N, Sirinarumitr K, Sirinarumitr T et al. (2022).** First report on clinical aspects, blood profiles, bacterial isolation, antimicrobial susceptibility, and histopathology in canine pyometra in Thailand. *Vet World*, 15(7), 1804.
- Liu R, Dai M, Gong G et al. (2022).** The role of extracellular matrix on unfavorable maternal-fetal interface: focusing on the function of collagen in human fertility. *J Leather Sci Eng*, 4(1), 13.
- Lopes CE, De Carli S, Riboldi CI et al. (2021).** Pet pyometra: correlating bacteria pathogenicity to endometrial histological changes. *Pathogens*, 10(7), 833.
- Melo RT, Oliveira RP, Silva BF et al. (2022).** Phylogeny and virulence factors of *Escherichia coli* isolated from dogs with pyometra. *Vet Sci*, 9(4), 158.
- Min J, Li B, Liu C et al. (2017).** Extracellular matrix metabolism disorder induced by mechanical strain on human parametrial ligament fibroblasts. *Mol Med Rep*, 15(5), 3278-3284.
- Oefner CM, Sharkey A, Gardner L et al. (2015).** Collagen type IV at the fetal-maternal interface. *Placenta*, 36(1), 59-68.
- Paping A, Basler C, Ehrlich L et al. (2023).** Uterine scars after caesarean delivery: From histology to the molecular and ultrastructural level. *Wound Repair Regen*, 31(6), 752-763.
- Pascottini OB, Aurich C, England G, Grahofner A. (2023).** General and comparative aspects of endometritis in domestic species: A review. *Reproduction in domestic animals*, 58(2), 49-71.
- Paudel M, Kafle S, Gombo TR, Khatri KB, Aryal A (2023).** Microbiological and hematological aspects of canine pyometra and associated risk factors. *Heliyon*, 9(12), e22368.
- Pretzer SD (2008).** Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: a review. *Theriogenology*, 70(3), 359-363.
- Quartuccio M, Liotta L, Cristarella S et al. (2020).** Contrast-enhanced ultrasound in cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: A preliminary study. *Animals*, 10(8), 1368.
- Ruiz-Lievano AP, Cervantes-Flores F, Nava-Torres A et al. (2024).** Fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infections: A systematic review. *Microorganisms*, 12(11), 2320.
- Schwarz S, Silley P, Simjee S et al. (2010).** Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *J Antimicrob Chemother*, 65(4), 601-604.
- Sen CK, Friday A, Khanna S, Roy S (2025).** Collagen-based products in wound, skin, and health care. *Adv Wound Care*, 10-177.
- Sugiura K, Nishikawa M, Ishiguro K et al. (2004).** Effect of ovarian hormones on periodical changes in immune resistance associated with estrous cycle in the beagle bitch. *Immunobiology*, 209(8), 619-627.
- Şababoğlu E, Öztürk D, Türütoğlu H (2021).** Isolation and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus canis* from dogs. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*, 32(1), 6-13.
- Şahin K, Altan GÜL Ş (2019).** Quinolone Resistant *Escherichia coli* Isolates Investigation of Resistance Rates to Other Antibiotics. *J Biotechnol Strategic Health Res*, 3(3), 197-202.
- Şamhoğlu P, Kılıç İ (2023).** İdrar Yolu İnfeksiyonlarında *Escherichia coli* ve *Klebsiella spp.*'de Trimetoprim-Sülfametaksazol ve Siprofloksasin Direnç Oranları: 10 Yıllık Değerlendirme. *Klinik Derg*, 36(3), 196-201.
- Tanaka T, Wang C, Umesaki N (2009).** Remodeling of the human endometrial epithelium is regulated by laminin and type IV collagen. *Int J Mol Med*, 23(2), 173-180.
- Woźna-Wysocka M, Rybska M, Błaszak B et al. (2021).** Morphological changes in bitches endometrium affected by cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex—the value of histopathological examination. *BMC Vet Res*, 17(1), 174.
- Xavier RGC, Santana CH, da Silva PHS et al. (2024).** Association between bacterial pathogenicity, endometrial histological changes and clinical prognosis in canine pyometra. *Theriogenology*, 214, 118-123.
- Xavier RGC, Santana CH, de Castro YG et al. (2023).** Canine pyometra: A short review of current advances. *Animals*, 13(21), 3310.
- Ylhäinen A, Mölsä S, Thomson K et al. (2025).** Bacteria associated with canine pyometra and concurrent bacteriuria: A prospective study. *Vet Microbiol*, 301(8), 110362.



Assessment of Serum Malondialdehyde (MDA), Reduced Glutathione (GSH) and Thiol-Disulfide Homeostasis in Neonatal Calves Diagnosed with Cryptosporidiosis

Yusuf Umut BATI^{1,*} Mert SEZER¹ Mustafa MAKAV² Enes AKYÜZ¹ Mushap KURU³ Ali Haydar KIRMIZIGÜL¹

¹ Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, 36100, Kars, Türkiye

² Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology, 36100, Kars, Türkiye

³ Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, 36100, Kars, Türkiye

Received: 30.01.2026

Accepted: 09.07.2026

ABSTRACT

Cryptosporidiosis is an important cause of neonatal calf diarrhea and may contribute to systemic oxidative and redox imbalance through intestinal epithelial injury, inflammation, and antioxidant consumption. Although malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) are commonly used indicators of lipid peroxidation and antioxidant defense, respectively, dynamic thiol-disulfide homeostasis (TDH) may provide complementary information on the circulating thiol pool and protein-based redox buffering capacity. However, data evaluating conventional oxidative stress biomarkers together with TDH parameters in neonatal calves with naturally occurring cryptosporidiosis remain limited. Therefore, this study aimed to assess serum MDA, GSH, and TDH parameters in neonatal calves diagnosed with cryptosporidiosis and to determine whether TDH components provide additional insight into cryptosporidiosis-associated redox alterations. The study was conducted on 40 calves aged 0–28 days, including 30 calves with cryptosporidiosis and 10 healthy controls. Diagnosis was established using an immunochromatographic test on fresh fecal samples, and only calves that tested negative for other enteric agents in the same panel were included. Serum MDA levels were measured using the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) method, GSH levels using the Beutler method, and total thiol (TT) and native thiol (NT) levels using the Erel-Neşelioğlu method; disulfide (Ds) levels and related ratios were calculated. In calves with cryptosporidiosis, serum GSH, TT, and NT levels were significantly lower than those in healthy controls ($p=0.010$, $p=0.010$, and $p=0.030$, respectively). Although MDA levels were numerically higher in the diseased group, the difference was not statistically significant ($p=0.150$). No significant differences were detected between groups for Ds levels or TDH-derived ratios (Ds/TT, Ds/NT, and NT/TT). These findings suggest that neonatal calf cryptosporidiosis may be associated mainly with depletion of antioxidant and thiol pools rather than a marked systemic lipid peroxidation response. In this context, TT and NT may represent supportive redox indicators for the evaluation of cryptosporidiosis-associated neonatal diarrhea.

Keywords: *Cryptosporidiosis, Malondialdehyde, Oxidative stress, Reduced Glutathione.*

ÖZ

Kriptosporidiyozlu Neonatal Buzağlarda Serum Malondialdehit, Redükte Glutasyon ve Tiyol-Disülfid Homeostazının Değerlendirilmesi

Kriptosporidiyoz, neonatal buzağı ishallerinin önemli nedenlerinden biri olup intestinal epitel hasarı, inflamasyon ve antioksidan tüketimi aracılığıyla sistemik oksidatif/redoks dengenin bozulmasına katkıda bulunabilir. Malondialdehit (MDA) lipid peroksidasyonunun, redükte glutasyon (GSH) ise antioksidan savunmanın yaygın kullanılan göstergeleri olmakla birlikte, dinamik tiyol-disülfid homeostazi (TDH) dolaşımdaki tiyol havuzu ve protein temelli redoks tamponlama kapasitesi hakkında tamamlayıcı bilgi sağlayabilir. Bununla birlikte, doğal olarak gelişen kriptosporidiyozlu neonatal buzağlarda klasik oksidatif stres belirteçleri ile TDH parametrelerini birlikte değerlendiren veriler sınırlıdır. Bu nedenle bu çalışmada, kriptosporidiyoz tanılı neonatal buzağlarda serum MDA, GSH ve TDH parametrelerinin değerlendirilmesi ve TDH bileşenlerinin kriptosporidiyozla ilişkili redoks değişiklikleri hakkında ek bilgi sağlayıp sağlamadığının ortaya konulması amaçlandı. Çalışma, 0–28 günlük toplam 40 buzağıda yürütüldü; 30 buzağı kriptosporidiyozlu, 10 buzağı ise sağlıklı kontrol grubunu oluşturdu. Tanı, taze dışkı örneklerinde immünokromatografik test ile konuldu ve aynı test panelinde diğer enterik etkenler yönünden negatif olan buzağlar çalışmaya dâhil edildi. Serum MDA düzeyleri tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) yöntemiyle, GSH düzeyleri Beutler yöntemiyle, toplam tiyol (TT) ve natif tiyol (NT) düzeyleri ise Erel-Neşelioğlu yöntemiyle ölçüldü; disülfid (Ds) düzeyi ve ilişkili oranlar hesaplandı. Kriptosporidiyozlu buzağlarda serum GSH, TT ve NT düzeyleri sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (sırasıyla $p=0,010$; $p=0,010$; $p=0,030$). MDA düzeyi hastalıklı grupta sayısal olarak daha yüksek olmasına rağmen fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,150$). Ds düzeyi ve TDH'den türetilen oranlar (Ds/TT, Ds/NT ve NT/TT) açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. Bu bulgular, neonatal buzağı kriptosporidiyozunda sistemik redoks yanıtın belirgin bir lipid peroksidasyon artışından çok antioksidan ve tiyol havuzunun tükenmesiyle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu bağlamda, TT ve NT kriptosporidiyozla ilişkili neonatal ishalin değerlendirilmesinde destekleyici redoks göstergeleri olarak değerlendirilebilir.

Anahtar Kelimeler: *İndirgenmiş glutasyon, Kriptosporidiyoz, Malondialdehid, Oksidatif stres.*



INTRODUCTION

Cryptosporidiosis is a major enteric disease of neonatal calves and represents an important component of neonatal calf diarrhea during the first weeks of life. Among *Cryptosporidium* species affecting ruminants, *C. parvum* is most commonly associated with diarrhea in young calves (Gong et al. 2017; Díaz et al. 2018; Kaduková et al. 2024). The infection primarily targets the intestinal epithelium, where epithelial damage, villus atrophy, and impaired absorptive function contribute to malabsorption, diarrhea, dehydration, weakness, and systemic deterioration (Naylor 2009; Thomson et al. 2017). Transmission occurs mainly through the fecal-oral route, and the environmental persistence of oocysts makes disease control difficult under farm conditions (Nugraha et al. 2021; Ryan et al. 2021; Cappellaro et al. 2023). In this context, cryptosporidiosis-associated diarrhea may disturb systemic oxidant-antioxidant balance, making redox-related biomarkers relevant for evaluating the host response in neonatal calves (Yüksek et al. 2021).

Oxidative stress occurs when oxidant production exceeds antioxidant defense capacity, leading to reactive oxygen species accumulation and oxidative damage to cellular components (Celi 2011; Ercan and Fidancı 2012). In neonatal calves with diarrhea, intestinal inflammation, impaired absorption, dehydration, and metabolic stress may increase oxidant burden and accelerate antioxidant consumption (Celi 2011; Yüksek et al. 2021). Malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) are frequently used to evaluate oxidative status. MDA is a secondary product of polyunsaturated fatty acid peroxidation and reflects oxidative membrane damage (Ayala et al. 2014; Hajimohammadi et al. 2023; Tesena et al. 2024), whereas GSH is a major endogenous antioxidant involved in the detoxification of hydrogen peroxide, lipid peroxides, and free radicals (Lu 2013; Uzun 2019). However, oxidative stress is a multifactorial process and may not be fully explained by a single lipid peroxidation marker or antioxidant parameter.

Thiols are redox-active compounds that contribute to antioxidant defense by reacting with oxidants and undergoing reversible conversion to disulfide bonds (Cremers and Jakob 2013; Erdoğan et al. 2019). Dynamic thiol-disulfide homeostasis (TDH), defined by native thiol, total thiol, disulfide levels, and their related ratios, is involved in detoxification, enzymatic regulation, apoptosis, and intracellular signaling pathways (Circu and Aw 2010; Erel and Neşelioğlu 2014). Compared with single oxidative stress markers, TDH provides broader information on the circulating thiol pool and protein-based redox buffering capacity. Therefore, alterations in TDH parameters under inflammatory or oxidative conditions may reflect consumption of thiol-dependent antioxidant reserves and disruption of systemic redox balance (Erdoğan et al. 2019; Erel and Erdoğan 2020).

Although oxidative stress has been investigated in neonatal calf diarrhea and in calves with cryptosporidiosis, studies evaluating MDA, GSH, and TDH parameters together in naturally occurring neonatal calf cryptosporidiosis remain limited. This represents an important knowledge gap, because combined assessment of conventional oxidative stress markers and TDH components may provide a broader biochemical perspective on cryptosporidiosis-associated redox alterations. Therefore, this study aimed to determine serum MDA, GSH, and TDH parameters in neonatal calves

with cryptosporidiosis and to compare them with those of healthy controls. We hypothesized that neonatal calves with cryptosporidiosis would exhibit oxidative/redox imbalance characterized particularly by depletion of GSH, total thiol, and native thiol levels.

MATERIAL AND METHODS

Ethical Approval

The study protocol was approved by the Kafkas University Local Ethics Committee for Animal Experiments (Decision date: 03.04.2024; Approval No. KAÜ-HADYEK/2024-064), ensuring compliance with relevant ethical standards. Additionally, blood samples were collected by following the recommended "standard sample collection procedure," ensuring that the animals were not exposed to stress in any way or harmed. All procedures related to the animals were carried out in accordance with institutional guidelines and national regulations on animal welfare.

Animal Material

This single-center clinical study was conducted at the Animal Hospital of the Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University, between 15 April 2024 and 15 April 2025. The individual calf was considered the experimental unit. A total of 40 neonatal calves aged 0–28 days were included in the study. The calves were classified into two groups according to clinical status and fecal immunochromatographic test results: calves diagnosed with cryptosporidiosis constituted the diseased group (n=30), and clinically healthy calves with negative fecal test results constituted the control group (n=10). All calves were Simmental or Simmental-crossbred. The diseased group consisted of diarrheic calves with clinical findings compatible with neonatal enteric disease and confirmed *Cryptosporidium* positivity. The control group consisted of clinically healthy calves without diarrhea or evident systemic clinical abnormalities at the time of examination and with negative results in the same fecal immunochromatographic test panel. Written informed consent was obtained from the animal owners before inclusion in the study.

Clinical Examination and Diagnostic Criteria

All calves were subjected to clinical examination before blood and fecal sampling. For the diseased group, the inclusion criteria were as follows: neonatal calves aged 0–28 days, presence of diarrhea at admission, compatible clinical findings including anorexia, weakness, and depression, no previous treatment before sampling, and fecal *Cryptosporidium* positivity. Calves were excluded from the diseased group if they had received antibiotics, antidiarrheal drugs, oral electrolyte solutions, or intravenous fluid therapy before admission. Calves with positivity for any other enteric agent evaluated in the same diagnostic test panel were also excluded in order to minimize the confounding effect of mixed enteric infections.

The clinical status of each calf was evaluated according to general behavior, alertness or depression, willingness to stand, suckling reflex, appetite status, hydration status, and the presence of diarrhea. Fresh fecal samples were collected directly from the rectum using clean disposable materials to prevent contamination. Cryptosporidiosis was diagnosed using a commercial immunochromatographic test kit (BovID-5 Ag Test Kit, BioNote Inc., Korea) in accordance with the manufacturer's instructions. Only calves that were positive for *Cryptosporidium* and

negative for the other enteric agents included in the same test panel were assigned to the diseased group.

The control group consisted of neonatal calves aged 0–28 days that were clinically healthy at the time of examination. Control calves had no diarrhea, anorexia, weakness, depression, or other evident systemic clinical abnormalities. In addition, fresh fecal samples obtained from control calves were evaluated using the same immunochromatographic test panel, and only calves with negative fecal test results were included as healthy controls.

Collection of Blood Samples

Blood samples were collected once from each calf during the initial clinical evaluation and, for diseased calves, before any treatment was administered. Sampling was performed from the jugular vein (V. jugularis) using appropriate restraint and a sterile vacuum blood collection system (Vacuette®, Greiner Bio-One GmbH, Austria). Blood samples were transferred into serum tubes for biochemical analyses. Serum was separated by centrifugation at 3000 rpm for 10 min using a Hettich Rotina 380R® centrifuge (Hettich, Germany). The obtained serum samples were aliquoted and stored at –20°C until the measurement of malondialdehyde, reduced glutathione, and thiol–disulfide homeostasis parameters.

Biochemical Analyses

Serum malondialdehyde (MDA) levels were determined spectrophotometrically using the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) method described by Yoshioka et al. (1979). Serum reduced glutathione (GSH) levels were measured according to the method of Beutler et al. (1963). Total thiol (TT) and native thiol (NT) concentrations were determined spectrophotometrically using the automated dynamic thiol–disulfide homeostasis method described by Erel and Neşelioğlu (2014). Disulfide (Ds) levels and TDH-derived ratios were calculated from TT and NT values using the following formulas: $Ds = (TT - NT) / 2$; $Ds/TT(\%) = (Ds/TT) \times 100$; $Ds/NT(\%) = (Ds/NT) \times 100$; and $NT/TT(\%) = (NT/TT) \times 100$.

Statistical Analysis

Data were assessed for normality using the Shapiro–Wilk test before statistical comparisons. Descriptive results were presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) to maintain consistency with the graphical presentation of the data. Variables that met the normality assumption (MDA, TT, and NT) were compared between the cryptosporidiosis and control groups using the unpaired independent-samples t-test. Variables that did not meet the normality assumption (GSH, disulfide, Ds/TT, Ds/NT, and NT/TT) were analyzed using the Mann–Whitney U test. Exact p values were reported to three decimal places, and p values <0.05 were considered statistically significant.

Because this was a clinical study based on naturally occurring cases, the final sample size was determined by the number of calves that met the predefined inclusion and exclusion criteria during the study period. The study included 30 calves with cryptosporidiosis and 10 healthy control calves. To evaluate the detectable standardized difference with the available sample size, a sensitivity power analysis was performed using G*Power version 3.1.9.7. For a two-tailed independent-samples t-test with $\alpha=0.05$, power=0.80, and the actual group sizes of 10 control and 30 diseased calves, the minimum detectable standardized difference was Cohen's $d=1.05$. This indicated that the available sample size was appropriate

for detecting large between-group differences, although smaller differences may not have been detected. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 8.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTS

The demographic, clinical, and diagnostic characteristics of the calves included in the study are presented in Table 1. The mean age was 11.4 ± 3.2 days in the control group and 13.8 ± 4.5 days in the cryptosporidiosis group. The age range was 4–21 days in the control group and 2–28 days in the cryptosporidiosis group. The sex distribution consisted of 6 males and 4 females in the control group and 16 males and 14 females in the cryptosporidiosis group. Simmental calves constituted 70.0% of the control group and 63.3% of the cryptosporidiosis group. Diarrhea was present in all calves with cryptosporidiosis and absent in all control calves. In the cryptosporidiosis group, anorexia, weakness, and depression were observed in 26/30, 28/30, and 22/30 calves, respectively. All calves in the cryptosporidiosis group were positive for fecal *Cryptosporidium* antigen and negative for the other enteric agents included in the same test panel, whereas all control calves were negative in the fecal test panel.

Serum oxidative stress biomarkers and thiol–disulfide homeostasis parameters are shown in Figure 1. Serum MDA concentration was numerically higher in calves with cryptosporidiosis than in healthy controls (1.31 vs. 1.24 nmol/mL); however, this difference was not statistically significant ($p=0.150$). In contrast, serum GSH concentration was significantly lower in the cryptosporidiosis group than in the control group (4.98 vs. 5.20 $\mu\text{mol/mL}$; $p=0.010$).

Regarding thiol–disulfide homeostasis parameters, total thiol (TT) and native thiol (NT) concentrations were significantly reduced in calves with cryptosporidiosis. The mean TT concentration was 221.32 $\mu\text{mol/L}$ in the cryptosporidiosis group and 295.60 $\mu\text{mol/L}$ in the control group ($p=0.010$). Similarly, the mean NT concentration was 200.96 $\mu\text{mol/L}$ in the cryptosporidiosis group and 267.00 $\mu\text{mol/L}$ in the control group ($p=0.030$).

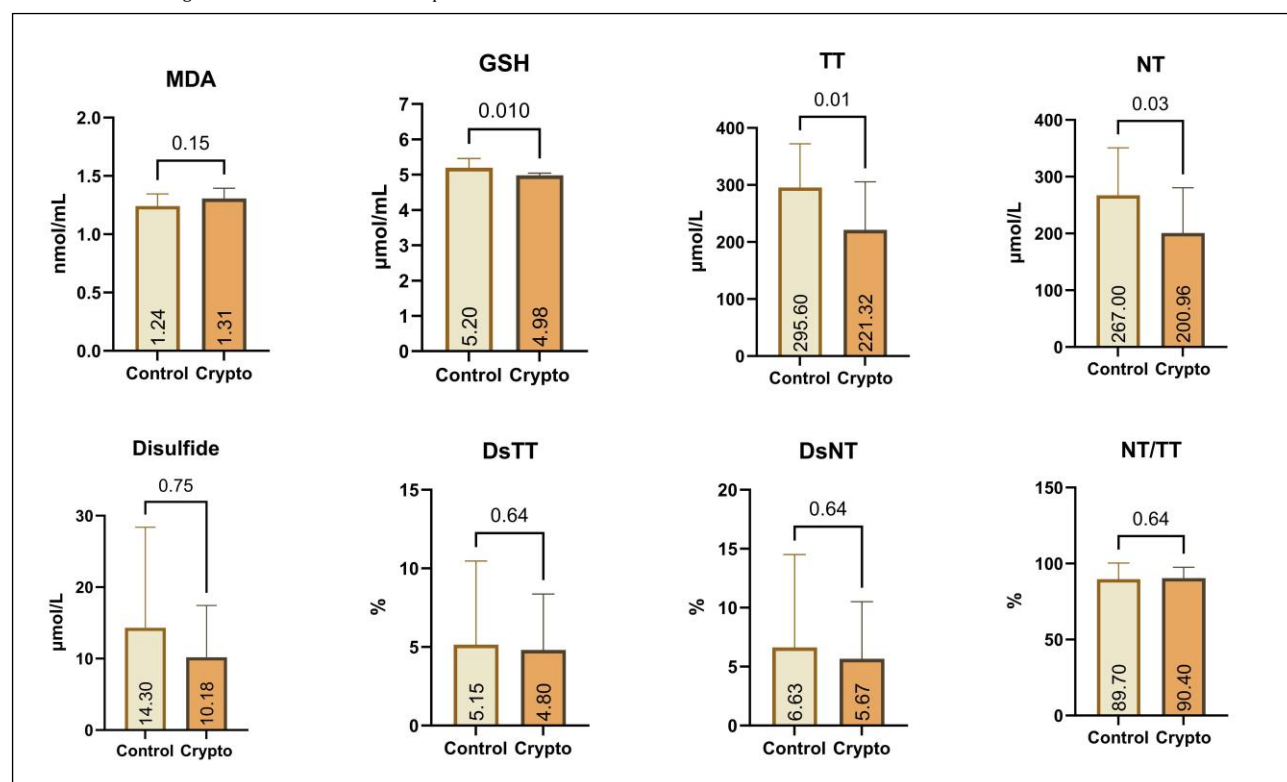
No statistically significant differences were detected between the groups for disulfide concentration or TDH-derived ratios. The mean disulfide concentration was 10.18 $\mu\text{mol/L}$ in calves with cryptosporidiosis and 14.30 $\mu\text{mol/L}$ in controls ($p=0.750$). The Ds/TT ratio was 4.80% in the cryptosporidiosis group and 5.15% in controls ($p=0.640$), while the Ds/NT ratio was 5.67% and 6.63%, respectively ($p=0.640$). The NT/TT ratio was also similar between groups, with values of 90.40% in calves with cryptosporidiosis and 89.70% in controls ($p=0.640$). Overall, calves with cryptosporidiosis showed significantly lower GSH, TT, and NT levels, whereas MDA, disulfide, and TDH-derived ratios did not differ significantly between groups.

The evaluated parameters were malondialdehyde (MDA, nmol/mL), reduced glutathione (GSH, $\mu\text{mol/mL}$), total thiol (TT, $\mu\text{mol/L}$), native thiol (NT, $\mu\text{mol/L}$), disulfide (Ds, $\mu\text{mol/L}$), and the ratios Ds/TT, Ds/NT, and NT/TT (%). Data are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD). MDA, TT, and NT were analyzed using the unpaired independent-samples t-test, whereas GSH, Ds, Ds/TT, Ds/NT, and NT/TT were analyzed using the Mann–Whitney U test. p values are indicated above the bars, and the corresponding exact p values are reported in the Results text.

Table 1: Demographic, clinical, and diagnostic characteristics of healthy control calves and calves with cryptosporidiosis.

Parameter	Control group (n=10)	Cryptosporidiosis group (n=30)
Age, days, mean $\pm$ SD	11.4 $\pm$ 3.2	13.8 $\pm$ 4.5
Age range, days	4–21	2–28
Sex, n (%)		
Male	6 (60.0)	16 (53.3)
Female	4 (40.0)	14 (46.7)
Breed, n (%)		
Simmental	7 (70.0)	19 (63.3)
Simmental-crossbred	3 (30.0)	11 (36.7)
Clinical findings, n (%)		
Diarrhea	0 (0.0)	30 (100.0)
Anorexia	0 (0.0)	26 (86.6)
Weakness	0 (0.0)	28 (93.3)
Depression	0 (0.0)	22 (73.3)
Diagnostic test results		
Fecal <i>Cryptosporidium</i> test	Negative	Positive
Other enteric agents in the test panel	Negative	Negative
Medical treatment before sampling	No	No

Data are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) for age and as n (%) for categorical variables. The control group consisted of clinically healthy calves with negative fecal immunochromatographic test results, whereas the cryptosporidiosis group consisted of diarrheic calves positive for *Cryptosporidium* and negative for the other enteric agents included in the same test panel.

**Figure 1:** Comparison of serum oxidative stress biomarkers and thiol-disulfide homeostasis parameters between healthy control calves (n=10) and calves with cryptosporidiosis (n=30).

DISCUSSION AND CONCLUSION

In this study, serum MDA levels were numerically higher in calves with cryptosporidiosis than in healthy controls; however, this difference was not statistically significant. MDA is a secondary aldehyde generated during the oxidative degradation of polyunsaturated fatty acids and is widely used as an indicator of lipid peroxidation (Ayala et al. 2014). The absence of a significant increase in MDA

suggests that systemic lipid peroxidation was not clearly detectable in the present cases. Similar findings have been reported by Isik and Ilhan (2018), who did not observe a significant change in oxidative status parameters, including MDA, in calves with cryptosporidiosis. In addition, Çenesiz et al. (2017) reported no significant difference in MDA levels before and after treatment in calves infected with *C. parvum*. Therefore, although MDA remains a useful marker of lipid peroxidation, the present

findings indicate that it may not be sufficiently discriminative as a standalone indicator of cryptosporidiosis-associated redox alterations. In this context, assessment of oxidative stress using complementary biomarkers rather than a single parameter may provide a more balanced biological interpretation (Celi 2011).

In this study, serum GSH levels were significantly lower in calves with cryptosporidiosis than in healthy controls. This finding suggests that antioxidant reserves may have been consumed in response to infection-associated oxidative and inflammatory burden. GSH is one of the major non-protein thiols in mammalian tissues and plays an important role in intracellular antioxidant defense, redox regulation, detoxification reactions, and immune-related cellular processes (Lu 2013; Aquilano et al. 2014). In ruminants, oxidative stress may develop as a result of increased oxidant production, reduced antioxidant availability, or accelerated antioxidant consumption; therefore, lower GSH levels in diarrheic enteric disease may reflect impaired oxidant–antioxidant balance (Celi 2011). Similar to our findings, El-Deeb et al. (2022) reported decreased GSH levels in calves with natural *C. parvum* infection, which was interpreted in relation to insufficient antioxidant capacity against free radical production. In addition, lower GSH levels reported in diarrheic calves of different etiologies support the view that intestinal inflammation can influence systemic redox status (Sağıroğlu et al. 2025). Since the calves in the present study were positive for *Cryptosporidium* and negative for the other enteric agents included in the test panel, the observed decrease in GSH may be interpreted more specifically as a component of the host redox response to cryptosporidiosis. However, this finding should be considered a supportive biochemical indicator rather than a standalone clinical marker.

In this study, TT and NT levels were significantly lower in calves with cryptosporidiosis than in healthy controls, suggesting depletion of the circulating thiol pool and reduced systemic redox buffering capacity. Thiol groups, particularly the –SH groups of albumin and other plasma proteins, constitute an important component of plasma antioxidant defense and can rapidly react with oxidants under conditions of increased oxidative burden (Young and Woodside 2001; Neşelioğlu et al. 2020). Within the TDH system, TT and NT provide information on the availability of reduced thiol reserves and protein-based redox status, thereby complementing conventional oxidative stress markers (Biswas et al. 2006; Circu and Aw 2010; Erel and Neşelioğlu 2014). In calves with cryptosporidiosis, intestinal epithelial injury and the associated inflammatory host response may increase oxidant production and antioxidant consumption (Thomson et al. 2017). In calves infected with *C. parvum*, alterations in antioxidant capacity and oxidative stress-related parameters have also been reported (Çenesiz et al. 2017). More generally, inflammatory and oxidative conditions are known to induce antioxidant responses and cellular redox adjustments (Espinosa-Diez et al. 2015). Therefore, the reduction in TT and NT observed in the present study may reflect consumption of thiol-dependent antioxidant reserves during cryptosporidiosis-associated neonatal diarrhea.

In contrast to the decreases in TT and NT, no statistically significant differences were observed in Ds levels or in the Ds/TT, Ds/NT, and NT/TT ratios. This finding suggests that the reduction in the circulating thiol pool was not accompanied by a clear shift toward increased disulfide

formation. Since Ds and the related ratios are calculated from TT and NT values, parallel decreases in TT and NT may limit marked changes in these proportional indices (Erel and Neşelioğlu 2014). In addition, thiol oxidation under inflammatory or oxidative conditions may involve different redox pathways, and therefore changes in thiol availability may not always be reflected by an isolated increase in Ds concentration (Erel and Erdoğan 2020). Similar variability in TDH-derived responses has been reported in neonatal calf diarrhea, where NT and TT may decrease while disulfide and ratio responses differ according to disease etiology and severity (Terzi et al. 2023). Findings from a parasitic inflammatory condition in sheep also support that reductions in thiol-related parameters may occur without a consistent shift in TDH ratios (Çamkerten et al. 2019). Therefore, the present results indicate that cryptosporidiosis in neonatal calves was associated mainly with depletion of TT and NT rather than a pronounced disulfide-dominant shift in TDH.

The main strength of the present study is the combined evaluation of MDA, GSH, and TDH parameters in naturally occurring *Cryptosporidium*-positive neonatal diarrhea before treatment. This approach highlighted GSH, TT, and NT as the most relevant altered indicators, suggesting depletion of antioxidant and thiol reserves, while MDA, Ds, and TDH-derived ratios did not show significant between-group differences.

This study also has some limitations. The sample size was relatively small and unbalanced, with 30 calves in the cryptosporidiosis group and 10 calves in the control group. In addition, this was a single-center clinical field study, and management-related factors such as colostrum intake, feeding conditions, housing, and environmental exposure could not be fully standardized. Blood samples were collected at a single time point; therefore, temporal changes in oxidative/redox parameters during the course of disease or after treatment could not be evaluated. Moreover, although disease severity was assessed clinically, biomarker concentrations were not analyzed according to severity scores. Etiological classification was based on a commercial immunochromatographic rapid diagnostic test kit, and molecular confirmation, fecal oocyst quantification, and detailed pathogen load assessment were not performed. Therefore, the diagnosis should be interpreted as a practical field-based diagnostic classification rather than molecular confirmation of *Cryptosporidium* infection. The study included only calves with *Cryptosporidium*-positive diarrhea and healthy controls; therefore, no additional disease-control group, such as calves with *E. coli*, coronavirus, rotavirus, or other etiologies of neonatal diarrhea, was available for comparison. Accordingly, the present findings should be interpreted as redox alterations associated with *Cryptosporidium*-positive neonatal diarrhea rather than as changes specific only to cryptosporidiosis when compared with other enteric diseases. In addition, acute-phase proteins and inflammatory cytokines were not measured in the present study. Therefore, the relationship between oxidative/redox alterations and systemic inflammatory responses could not be directly evaluated. These limitations should be considered when interpreting the biological relevance, etiological specificity, and practical applicability of the findings.

In conclusion, neonatal calves with cryptosporidiosis showed a redox alteration pattern characterized mainly by reduced GSH, TT, and NT levels, whereas MDA, Ds, and TDH-derived ratios did not differ significantly from healthy controls. These findings indicate that GSH, TT, and

NT were the most informative supportive indicators of antioxidant and thiol reserve depletion in Cryptosporidium-positive neonatal diarrhea. In contrast, MDA, Ds, and TDH-derived ratios appeared less discriminative in the present study. However, considering the small and unbalanced sample size, single time-point sampling, field-related variability, and the absence of additional disease-control groups, these biomarkers should not be interpreted as standalone disease-specific clinical markers. Larger longitudinal studies are needed to validate their biological relevance and potential research utility in neonatal calf cryptosporidiosis.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Idea/Concept: MK

Supervision/Consultancy: EA

Data Collection and/or Processing: YUB, MS

Analysis and/or Interpretation: MM

Writing the Article: YUB

Critical Review: AHK

REFERENCES

- Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR (2014). Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front Pharmacol*, 5, 196.
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 360438.
- Beutler E, Duron O, Kelly BM (1963). Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*, 61, 882-888.
- Biswas S, Chida AS, Rahman I (2006). Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling. *Biochem Pharmacol*, 71(5), 551-564.
- Cappellaro V, Matzembacker B, Chitolina MB et al. (2023). Cryptosporidium infection in diarrheal bovine dairy calves: occurrence and risk factors in Santa Catarina, Brazil. *Semina: Ciênc Agrár*, 44(1), 317-328.
- Celi P (2011). Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 33(2), 233-240.
- Circu ML, Aw TY (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 48(6), 749-762.
- Cremers CM, Jakob U (2013). Oxidant sensing by reversible disulfide bond formation. *J Biol Chem*, 288(37), 26489-26496.
- Çamkerten İ, Çamkerten G, Erdoğan H et al. (2019). Serum thiol disulphide levels among sheep with sarcoptic mange. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 25(6), 865-868.
- Çenesiz M, Sağkan Öztürk A, Dalğın D et al. (2017). Investigation of acute phase reactants and antioxidant capacity in calves infected with Cryptosporidium parvum. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 23(3), 481-485.
- Díaz P, Varcasia A, Pipia AP et al. (2018). Molecular characterisation and risk factor analysis of Cryptosporidium spp. in calves from Italy. *Parasitol Res*, 117(10), 3081-3090.
- El-Deeb W, Iacob O, Fayez M et al. (2022). Assessment of the immune response of clinically infected calves to cryptosporidium parvum infection. *Agriculture*, 12(8), 1151.
- Ercan N, Fidancı UR (2012). Urine 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) levels of dogs in pyoderma. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 59(3), 163-168.
- Erdoğan H, Çamkerten İ, Çamkerten G et al. (2019). The effect of hot-iron disbudding on thiol-disulphide homeostasis in calves. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 25(3), 335-339.
- Erel Ö, Erdoğan S (2020). Thiol-disulfide homeostasis: An integrated approach with biochemical and clinical aspects. *Turk J Med Sci*, 50(S1-2), 1728-1738.
- Erel Ö, Neşelioğlu S (2014). A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis. *Clin Biochem*, 47(18), 326-332.
- Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D et al. (2015). Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol*, 6, 183-197.
- Gong C, Cao XF, Deng L et al. (2017). Epidemiology of Cryptosporidium infection in cattle in China: A review. *Parasite*, 24, 1.
- Hajimohammadi A, Ghane M, Ghari Tehrani M et al. (2023). Association of the severity of colic in horses with oxidative stress biomarkers, acute-phase proteins, and certain trace elements. *J Equine Sci*, 34(3), 73-81.
- Isik N, İlhan C (2018). Oxidative status and organ damage marker parameters in calf cryptosporidiosis. *Bionature*, 38(3), 139-145.
- Kaduková M, Schreiberová A, Mudroň P et al. (2024). Cryptosporidium infections in neonatal calves on a dairy farm. *Microorganisms*, 12(7), 1416.
- Lu SC (2013). Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1830(5), 3143-3153.
- Naylor JM (2009). Neonatal calf diarrhea. Anderson DE, Rings M (Ed). Food Animal Practice (pp. 70-77). Saunders Elsevier, St. Louis.
- Neşelioğlu S, Şenat A, Fırat Oğuz E, Alışık M, Erel Ö (2020). A novel and semiautomated assay for thiol oxidative stress index: TOSI. *Kırıkkale Univ Med*, 22(2), 271-280.
- Nugraha AB, Cahyaningsih U, Sudarnika E (2021). Prevalence and risk factors of Cryptosporidium spp. on dairy farms in Bogor. *J Sain Vet*, 39(1), 13-19.
- Ryan UM, Feng Y, Fayer R, Xiao L (2021). Taxonomy and molecular epidemiology of Cryptosporidium and Giardia: A 50 year perspective (1971-2021). *Int J Parasitol*, 51(13-14), 1099-1119.
- Sağiroğlu M, Çalışkan M, Geçmez Cahan K, Baykal A, Akça B (2025). Investigation of the relationship between blood gas and oxidative stress parameters in calves with diarrhea. *FU Vet J Health Sci*, 39(2), 108-112.
- Terzi OS, Kara E, Şenel Y et al. (2023). Dynamic thiol-disulphide homeostasis and ischemia modified albumin levels in neonatal calf diarrhea. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 70(1), 81-86.
- Tesena P, Vinijkumthorn R, Preuksathaporn T et al. (2024). Evaluation of gastrointestinal tract lesions and serum malondialdehyde levels after repeated oral administration of phenylbutazone in horses. *Vet Res Commun*, 48(4), 2343-2355.
- Thomson S, Hamilton CA, Hope JC et al. (2017). Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control strategies. *Vet Res*, 48, 42.
- Uzun N (2019). The analysis of glutathione level and superoxide dismutase activity in normal and preeclampsia pregnant. *EJVS*, 5(1), 23-29.
- Yoshioka T, Kawada K, Shimada T, Mori M (1979). Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *Am J Obstet Gynecol*, 135(3), 372-376.
- Young IS, Woodside JV (2001). Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, 54(3), 176-186.
- Yüksek N, Çatalkaya E, Başbugan Y, Yayan M (2021). Effect of probiotic on total antioxidant (TAS) and total oxidant (TOS) in treatment of newborn calf diarrhea. *TJVR*, 5(1), 11-15.



Karakaş Koyunlarında Meme Morfolojisinin Süt Verimine, Sütün Fiziksel Özellikleri ve Kimyasal Bileşenlerine Etkisi

Hasan DENK¹ Orhan YILMAZ^{2,*} ¹ Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 65080, Van, Türkiye² Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Zootehni Anabilim Dalı, 65080, Van, Türkiye

Geliş Tarihi: 04.02.2026

Kabul Tarihi: 15.04.2026

ÖZ

Bu çalışma, Karakaş koyunlarında meme morfolojisinin süt verimi, meme ölçüleri ile sütün fiziksel özellikleri ve kimyasal bileşimi üzerindeki potansiyel etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla yapıldı. Çalışmanın materyalini 50 baş Karakaş koyunu oluşturmıştır. Karakaş koyunlarında 4 farklı meme tipi tanımlanmıştır. Meme tipinin laktasyon süt verimi üzerindeki etkisinin önemsiz, meme genişliği hariç tüm meme ölçüleri üzerindeki etkisinin önemli, hem sütün fiziksel özelliklerine hem de sütün kimyasal bileşenlerine etkisinin önemsiz olduğu belirlenmiştir. Laktasyon süt verimi ile meme çevresi, derinliği, genişliği, meme başı-yer arası uzaklık, sağ meme başı uzunluğu, sol meme başı uzunluğu, sağ meme başı çapı ve sol meme başı çapı arasındaki fenotipik korelasyon katsayılarının negatif ve düşük ($r=-0.01$ ile -0.22), ayrıca laktasyon süt verimi ile süt proteini, yağsız kuru madde ve laktoz arasındaki korelasyon katsayılarının negatif ve düşük ($r=-0.09$ ile -0.14) olduğu saptanmıştır. Laktasyon süt verimi ile süt yağı ve meme başları arası uzaklığı arasındaki korelasyon katsayılarının ise pozitif ve düşük ($r=0.01$ ile 0.17) olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, Karakaş koyunlarında meme tipinin laktasyon süt verimi ile sütün fiziksel özellikleri ve kimyasal bileşenleri üzerine etkisinin önemsiz olduğu, buna karşılık meme genişliği hariç tüm meme ölçümleri üzerinde anlamlı düzeyde etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca laktasyon süt verimi ile meme ölçüleri ve sütün kimyasal bileşenleri arasında anlamlı bir korelasyon bulunmadığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fiziksel özellikler, Kimyasal bileşenler, Koyun, Meme tipi, Süt verimi.

ABSTRACT

The Effect of Udder Morphology on Milk Yield, Physical Traits and Chemical Components of Milk in Karakaş Sheep

The aim of this study was to evaluate the potential effects of udder morphology on milk yield, udder measurements, and the physical characteristics and chemical composition of milk in Karakaş ewes. Animal material consisted of 50 Karakaş ewes. Four different udder types have been identified in ewes. The effect of udder type on lactation milk yield was insignificant. The effect of udder type on all udder measurements were significant, except udder width. The effect of udder type on both physical traits and chemical components of milk was insignificant. The phenotypic correlation coefficients between lactation milk yield and udder circumference, depth, width, teat-to-ground distance, right teat length, left teat length, right teat diameter, and left teat diameter were found to be negative and low ($r=-0.01$ to -0.22), and the correlation coefficients between lactation milk yield and milk protein, non-fat solids, and lactose were also found to be negative and low ($r=-0.09$ to -0.14). On the other hand, the correlation coefficients between lactation milk yield, milk fat, and distance between teat were found to be positive and low ($r=0.01$ to 0.17). In conclusion, it was determined that the effect of udder type in Karakaş ewes on lactation milk yield, as well as on the physical characteristics and chemical components of milk, was insignificant; however, it had a significant effect on all udder measurements except for udder width. Additionally, no significant correlations were detected between lactation milk yield and udder measurements or the chemical components of milk.

Keywords: Chemical components, Milk production, Udder type, Physical traits, Sheep.

GİRİŞ

Hayvancılık, küresel olarak dinamik bir sektör olup, gelişmekte olan ülkelerin ekonomisine önemli katkı sağlamaktadır (Gezginç 2022). Küçükbaş hayvan yetiştiriciliği, hem Türkiye’de hem de dünya genelinde gıda

güvenliği, ekonomik sürdürülebilirlik ve kırsal kalkınma açısından stratejik bir öneme sahiptir. Türkiye’nin sahip olduğu geniş meralar, uygun iklim koşulları ve geleneksel bilgi birikimi, küçükbaş hayvancılığı için önemli avantajlar sunmaktadır (Gezginç 2025).



Küçükbaş hayvanların en önemli verimlerinden biri süt üretimidir. Son yıllarda, koyun ve keçi memelerinin morfolojisi üzerine yapılan araştırmalarda, sadece makineyle sağım için uygunluğu açısından değil, aynı zamanda süt verimi ve meme bezi sağlığı açısından da artan bir eğilim gözlemlenmektedir (Vrdoljak ve ark. 2020).

Süt üretiminin doğrudan ölçümü genellikle zahmetlidir ve üretim sistemlerinin çoğunda mümkün olmayabilir. Çiftçilerin, süt üretimini öngörebileceği ölçümleri kullanması yararlı olabilir.

Meme ölçüleri süt verimine, mekanik sağıma ve genetik iyileştirmeye katkıda bulunabilir (İñiguez ve ark. 2009). Süt verimi, memenin morfolojik yapısından etkilenir (Legarra ve Ugarte 2005; Casu ve ark. 2006; Margetin ve ark. 2012; Merkhani 2014). Barillet (2007), koyunlarda mekanik sağım uygulanmaya başlandığından beri meme tipinin ekonomik öneminin büyük ölçüde arttığını belirtmiştir.

Dağ ve Zülkadir (2004), meme tipi ve meme başı yerleşiminin memede kalan süt miktarı ve süt akışını etkilediğini ve memenin tamamen boşalmasını zorlaştıran meme tiplerinin hastalığa (mastitis) yakalanma olasılığını artırdığını bildirmiştir.

İngiliz Milkschaf ve İvesi koyunlarında süt miktarının meme başı büyüklüğü arttıkça azaldığını ve meme tiplerinin süt verimi üzerine etkisinin az olduğunu, ancak makineyle sağım açısından çok önemli olduğunu ve seleksiyon sırasında meme özelliklerinin dikkate alınmasının faydalı olacağını bildirilmiştir (Kukovics ve ark. 2006).

Frizarta koyunlarında meme çevresinin, genişliğinin, derinliğinin ve meme başı uzunluğunun süt verimini önemli ölçüde etkilediği, ancak bu ölçülerin sütün kimyasal bileşenleri üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Kominakis ve ark. 2009). Bazı çalışmalarda da meme tipinin süt verimine ve sütün kimyasal bileşenlerine önemli bir etkisinin olmadığı ifade edilmiştir (Koçak ve ark. 2018; Özyürek 2020).

Milerski ve ark. (2020), koyunlarda meme genişliği ve derinliğinin hem süt veriminin belirlenmesinde hem de sürü yönetiminde kullanılabileceğini bildirmiştir. Bununla birlikte, meme ölçümlerinin süt bileşimini tahmin etmede güvenilir olmadığını belirtmişlerdir. Devi ve ark. (2022), meme başı morfolojisinin kuzuların emme davranışını etkilediğini, sol ve sağ meme başları arasında belirgin bir ayrım bulunan annelerin kuzularının daha uzun süre emdiğini bildirmişlerdir.

Dolayısıyla literatür bulgularından, ülkemiz yerli koyun ırklarının ve varyetelerinin meme morfolojilerinin detaylı araştırılmasının seleksiyon, sürü yönetimi ve hayvansal üretim açısından yararlı olacağı anlaşılmaktadır. Bu nedenle, bu çalışma, ülkemiz yerli koyunlarından Karakaş koyunlarında meme morfolojisinin süt verimi, meme ölçüleri ile sütün fiziksel özellikleri ve kimyasal bileşimi üzerindeki potansiyel etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla yapılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Etik Onay

Bu çalışma, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 28.01.2021 tarihinde 2021/01/01 sayılı izin alınarak yapılmıştır.

Hayvan Materyali

Çalışma, Van ili Gevaş ilçesi Aladüz köyünde bir koyunculuk işletmesinde 2-2.5 yaşlı 50 baş Karakaş koyunu üzerinde yürütülmüştür.

Koyunların Beslenmesi

Koyunlar, iklim şartlarının uygun olduğu günlerde merada otlatılmış, iklim şartlarının uygun olmadığı günlerde ise ağılda barındırılarak, sabah *ad libitum* yonca, korunga ve saman; akşam arpa (koyun başına ortalama 330 g) ve *ad libitum* saman ile beslenmişlerdir.

Meme Tiplerinin Tespiti

Koyunların meme tipleri, Kukovics ve ark. (2006)'nın bildirişine göre belirlenmiştir.

Meme tipleri;

Tip I: Meme başları horizontal, meme lobları ayrılmamış.

Tip II: Meme başları horizontala yakın, meme lobları biraz ayrılmış.

Tip III: Meme başları horizontal ile vertikal arası, meme lobları belirgin.

Tip IV: Meme başları vertikal veya vertikal yakın, meme lobları belirgin.

Meme Ölçülerinin Tespiti

Koyunların meme ve meme başı ölçüleri laktasyonun 60. gününde akşam sağımından 2 saat önce belirlenmiştir (Dzidic ve ark. 2004). Meme ve meme başı ölçüleri şekil 2'den yararlanılarak belirlenmiştir (Ünal ve ark. 2008). Meme derinliği, meme genişliği, meme başları arası uzaklığı, sağ-sol meme başı uzunlukları, sağ-sol meme başı çapları dijital kumpasla, meme başı-yer arası uzaklığı ve meme çevresi mezura ile ölçülmüştür.

Laktasyon Süt Veriminin Tespiti

Laktasyon süt verimi İsveç yöntemiyle belirlenmiştir (Kaymakçı 2006).

İsveç yöntemi;

$$LSV = a \sum_{i=1}^n k_i - \left(\frac{a}{2} - A\right) k_1$$

Formülde;

LSV: Laktasyon süt verimi

n: Süt denetim sayısı

a: Süt denetim aralığı

A: Doğum tarihi ile ilk süt denetimi arasındaki süre

$\sum_{i=1}^n k_i$ = Süt denetim günlerinde saptanan süt verimlerinin toplamı

k_1 : İlk denetimde elde edilen süt miktarı

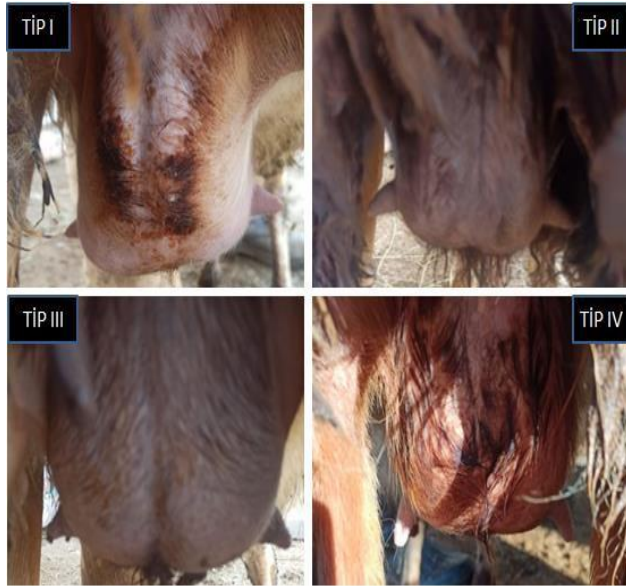
Sütün Fiziksel Özellikleri ile Kimyasal Bileşenlerin Tespiti

Süt denetim günlerinde, her bir koyundan sabah ve akşam sağımlarında 50 ml süt numunesi alındı. Süt numuneleri analiz zamanına kadar +4 °C'de muhafaza edildi.

Süt numunelerinin fiziksel ve kimyasal analizleri Milkotester Master PRO (Milkotester Ltd, Belovo, Bulgaristan) süt analiz cihazında yapıldı.

İstatistiksel Analizler

Örneklem büyüklüğü: Çalışmanın örneklem büyüklüğünü belirlemek için G*Power (Sürüm 3.1.9.7; Düsseldorf, Mannheim ve Kiel Üniversiteleri, Almanya) kullanılmıştır. Böylece, 0.50 etki boyutu ($f=0.50$), %5 Tip I hata ($\alpha=0.05$) ve %80 ($1-\beta=0.80$) güç değerleri ile çalışma için asgari örneklem büyüklüğü 50 ($n=50$) olarak belirlenmiştir.



Şekil 1: Karakaş koyunlarında meme tipleri

Figure 1: Udder types in Karakaş sheep.

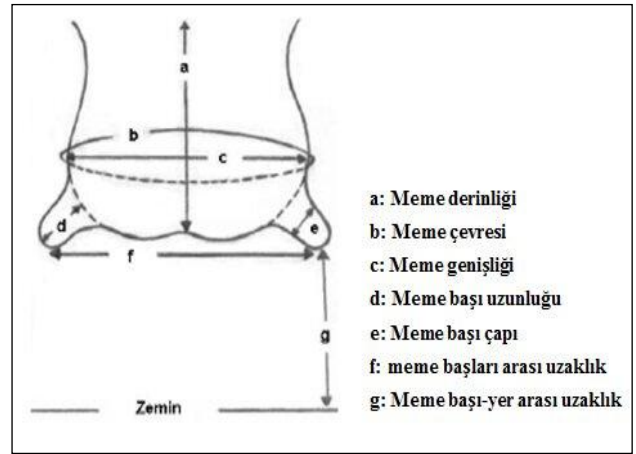
Çalışmada ele alınan özelliklerden sürekli değişkenler için tanımlayıcı istatistikler; ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerler olarak ifade edilirken, Kategorik değişkenler için sayı ve yüzde olarak ifade edilmiştir. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uyup uymadığını test etmek üzere, Kolmogorov-Smirnov testi yapılmış ve basıklık/çarpıklık katsayıları hesaplanmıştır. Normallik testi sonucunda, verilerin normal dağılım gösterdiği gözlenmiş ve bağımsız grup ortalamalarını karşılaştırmada Tek Yönlü Varyans Analizi (One-way ANOVA) yapılmıştır. Varyans analizlerini takiben, farklı grupları belirlemek üzere, Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Özellikler arasındaki ilişkileri belirlemek üzere, Pearson korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Hesaplamalarda istatistik önemlilik (anlamlılık) düzeyi %5 olarak alınmış ve istatistik hesaplamalar için SPSS (ver: 21) paket programı (SPSS 2020) kullanılmıştır.

Tablo 1: Karakaş koyunlarının meme tiplerine göre süt verimleri ve meme ölçüleri ($\bar{X} \pm SD$).

Table 1: Milk yields and udder sizes according to udder type of Karakaş sheep ($\bar{X} \pm SD$).

Faktör	n	Laktasyon süt verimi (kg)	Meme çevresi (cm)	Meme derinliği (cm)	Meme genişliği (cm)	Meme başı-yer arası uzaklık (cm)
Meme tipi						
Tip I	13	45.04±1.87	33.62±3.71 ^b	11.25±5.16 ^{ab}	7.99±0.61	34.31±2.27 ^a
Tip II	14	42.86±3.70	40.29±5.50 ^a	9.87±1.38 ^b	8.06±1.49	33.21±3.37 ^a
Tip III	14	42.92±3.14	38.57±2.20 ^a	12.87±1.09 ^a	8.70±0.37	30.36±3.37 ^b
Tip IV	9	43.46±2.34	32.89±0.81 ^b	11.24±0.45 ^{ab}	8.23±0.57	30.00±3.69 ^b
		p=0.202	p=0.001	p=0.058	p=0.198	p=0.003
Genel	50	43.55±2.97	36.74±4.81	11.31±2.97	8.25±0.99	32.12±3.54
		Sağ meme başı uzunluğu (cm)	Sol meme başı uzunluğu (cm)	Sağ meme başı çapı (cm)	Sol meme başı çapı (cm)	İki meme başı arası uzaklık (cm)
Meme tipi						
Tip I	13	1.89±0.72 ^c	1.92±0.79 ^c	1.30±0.22 ^c	1.56±0.76 ^c	11.61±0.50 ^b
Tip II	14	2.13±0.67 ^c	2.05±0.64 ^c	1.68±0.15 ^b	1.61±0.79 ^c	12.49±1.01 ^a
Tip III	14	2.91±0.75 ^b	2.87±0.79 ^b	1.81±0.34 ^b	1.84±0.82 ^b	12.47±0.64 ^a
Tip IV	9	3.94±0.18 ^a	3.96±0.60 ^a	2.49±0.15 ^a	2.65±0.45 ^a	12.91±0.39 ^a
		p=0.001	p=0.001	p=0.001	p=0.001	p=0.001
Genel	50	2.62±0.92	2.59±0.99	1.76±0.42	1.85±3.11	12.33±0.85

Verilerin analizinde, Tek Yönlü Varyans Analizi (One-way ANOVA) kullanılmıştır. p: İstatistiksel anlamlılık düzeyi. a, b, c: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir (Duncan çoklu karşılaştırma testi).



Şekil 2: Meme ölçüleri (Ünal ve ark. 2008).

Figure 2: Udder measurements (Ünal ve ark. 2008).

BULGULAR

Süt Verimi ve Meme Ölçüleri

Karakaş koyunlarının meme tiplerine göre süt verimleri ve meme ölçüleri Tablo 1'de verilmiştir. Meme tipinin, meme çevresi, meme derinliği, Meme başı ile yer arasındaki uzaklık, sağ meme başı uzunluğu, sol meme başı uzunluğu, sağ meme başı çapı, sol meme başı çapı ve Meme başı ile yer arasındaki uzaklık gibi meme ölçülerine etkisinin önemli; laktasyon süt verimi ve meme genişliğine etkisinin ise önemsiz olduğu gözlenmiştir.

Sütün Fiziksel Özellikleri

Karakaş koyunlarının meme tiplerine göre sütlerinin fiziksel özellikleri Tablo 2'de verilmiştir. Meme tipinin, sütün yoğunluğu, donma noktası, iletkenliği ve pH'sı gibi fiziksel özellikler üzerindeki etkisinin anlamlı olmadığı ($p>0.05$) gözlenmiştir.

Sütün Kimyasal Bileşenleri

Karakaş koyunlarının meme tiplerine göre sütlerinin kimyasal bileşenleri Tablo 3'te verilmiştir. Meme tipinin, süt yağı, protein, yağsız kuru madde ve laktoz üzerine etkisinin önemsiz ($p>0.05$) olduğu gözlenmiştir.

Fenotipik Korelasyonlar

Laktasyon süt verimi ile meme ölçüleri ve sütün kimyasal bileşenleri arasındaki fenotipik korelasyonlar Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4 incelendiğinde, laktasyon süt verimi ile meme başları arası uzaklık, laktasyon süt verimi ile süt yağı

arasında pozitif ve önemsiz korelasyon katsayısı, laktasyon süt verimi ile diğer meme ölçüleri, süt proteini, yağsız kuru madde ve laktoz bileşenleri arasında ise negatif ve önemsiz korelasyon katsayıları saptanmıştır.

Meme çevresi ile meme genişliği, meme çevresi ile meme başları arası uzaklık, sağ meme başı uzunluğu ile sağ meme başı çapı, sağ meme başı uzunluğu ile sol meme başı uzunluğu, sol meme başı çapı ile sağ meme başı çapı, sağ ve sol meme başı çapları ile meme başı-yer arası uzaklık, süt proteini ile yağsız kuru madde, süt proteini ile laktoz ve yağsız kuru madde ile laktoz arasında pozitif ve yüksek korelasyon katsayıları hesaplanmıştır.

Tablo 2: Karakaş koyunlarının meme tiplerine göre sütlerinin fiziksel özellikleri ($\bar{X} \pm SD$).

Table 2: Physical characteristics of milk according to udder type of Karakaş sheep ($\bar{X} \pm SD$).

Faktör	n	Özgül ağırlık (g/ml)	Donma noktası (°C)	Elektrik iletkenliği (mS/cm)	pH
Meme Tipi					
Tip I	13	1.035±0.00	-0.875±0.07	4.961±0.29	6.80±0.22
Tip II	14	1.037±0.00	-0.877±0.07	4.879±0.19	6.71±0.15
Tip III	14	1.035±0.00	-0.874±0.04	4.836±0.22	6.71±0.11
Tip IV	9	1.036±0.00	-0.875±0.03	4.933±0.30	6.78±0.24
		p=0.641	p=0.384	p=0.440	p=0.276
Genel	50	1.036±0.00	-0.876±0.07	4.898±0.28	6.75±2.47

Verilerin analizinde, Tek Yönlü Varyans Analizi (One-way ANOVA) kullanılmıştır.
p: İstatistiksel anlamlılık düzeyi.

Tablo 3: Karakaş koyunlarının meme tiplerine göre sütlerinin kimyasal bileşenleri ($\bar{X} \pm SD$).

Table 3: Chemical composition of milk according to udder type of Karakaş sheep ($\bar{X} \pm SD$).

Faktör	n	Yağ (%)	Protein (%)	Yağsız kuru madde (%)	Laktoz (%)
Meme tipi					
Tip I	13	8.58±1.65	4.33±0.22	11.87±0.69	6.50±0.32
Tip II	14	8.34±1.65	4.38±0.19	11.92±0.56	6.53±0.22
Tip III	14	8.60±1.16	4.26±0.34	11.78±0.41	6.52±0.34
Tip IV	9	8.45±0.84	4.36±0.15	11.77±0.36	6.53±0.21
		p=0.962	p=0.661	p=0.873	p=0.991
Genel	50	8.49±1.34	4.33±0.09	11.84±0.28	6.52±0.28

Verilerin analizinde, Tek Yönlü Varyans Analizi (One-way ANOVA) kullanılmıştır.
p: İstatistiksel anlamlılık düzeyi.

Tablo 4: Laktasyon süt verimi ile meme ölçüleri ve sütün kimyasal bileşenleri arasındaki fenotipik korelasyonlar.

Table 4: Phenotypic correlations between udder measurements and chemical components of milk with lactation milk yield.

Faktörler	MÇ	MD	MG	MBYAU	SAMBU	SOMBU	SAMBÇ	SOMBÇ	MBAU	Y	P	YKM	L
LSV	-0.09	-0.01	-0.17	-0.19	-0.22	-0.11	-0.15	-0.14	0.01	0.17	-0.09	-0.09	-0.14
MÇ		0.16	0.45**	0.12	-0.05	-0.06	0.07	-0.15	0.44**	0.77	0.06	-0.11	-0.04
MD			0.29	-0.21	0.26	0.26	0.23	0.19	0.16	0.02	0.01	-0.11	-0.01
MG				0.03	0.19	0.19	0.24	0.24	0.44**	0.07	0.07	-0.03	0.07
MBYAU					-0.27	-0.27	-0.40**	-0.39**	-0.38**	-0.19	0.14	0.0	0.04
SAMBU						0.94**	0.73**	0.76**	0.32*	-0.13	0.01	-0.13	-0.01
SOMBU							0.70**	0.76**	0.37**	-0.03	-0.29	-0.19	-0.05
SAMBÇ								0.86**	0.65**	0.07	0.15	-0.06	0.17
SOMBÇ									0.54**	-0.01	0.05	-0.16	0.05
MBAU										0.07	-0.03	-0.15	0.01
Y											0.09	0.17	0.18
P												0.60**	0.65**
YKM													0.90**

* $p<0.05$; ** $p<0.01$

LSV: Laktasyon süt verimi, MÇ: Meme çevresi, MD: Meme derinliği, MG: Meme genişliği, MBYAU: Meme başı-yer arası uzaklık, SAMBU: Sağ meme başı uzunluğu, SOMBU: Sol meme başı uzunluğu, SAMBÇ: Sağ meme başı çapı, SOMBÇ: Sol meme başı çapı, MBAU: Meme başları arası uzaklık, Y: Yağ, P: Protein, YKM: Yağsız kuru madde, L: Laktoz.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Meme morfolojisi ve şeklinin, süt veriminde önemli belirleyici özellikler oldukları (James ve ark. 2004), sürüler arasında meme ölçülerinin laktasyon dönemlerine göre önemli ölçüde değişebileceği (İñiguez ve ark. 2009), süt veriminin meme büyüklüğünü ve şeklini belirleyen önemli bir faktör olduğu (Lérias ve ark. 2014), süt verimini iyileştirmek için ıslah programlarında belirli meme morfolojisinin kullanılmasının gerekliliği (Gutiérrez-Gil ve ark. 2008), meme tipi ile süt verimi arasındaki ilişkinin oldukça değişken ve genotipe bağlı olduğu (Kukovics ve ark. 2006) bildirilmiştir.

Bu çalışmada, Karakas koyunlarında meme tipinin laktasyon süt verimine etkisinin önemsiz olduğu saptanmıştır. Bu bulgu, İvesi (Dağ ve Zülkadir 2004; Özyürek 2020; Şeker ve ark. 2022) ve Morkaraman koyunları (Özyürek 2020) için bildirilen bulgulara benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Benzer şekilde, İstriya, Pag ve İvesi koyunlarında da meme tipinin süt verimine anlamlı bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (İlyas ve Karakuş 2020; Prpić ve ark. 2020). Ancak, Prpić ve ark. (2020), Doğu Friesian koyunlarında meme tipinin süt verimini önemli düzeyde etkilediğini bildirmişlerdir.

Ayrıca bazı çalışmalarda, süt verimine meme tipinin etkisinin, Acıpayam, Anadolu Merinosu ve İvesi koyunlarda önemli düzeyde etkili olduğu bildirilmiştir (Özbaşer ve Akçapınar 2011; Doğan ve ark. 2013; Kaygısız ve Dağ 2017).

Çalışmada, Karakas koyunlarında meme tipinin, meme çevresi, meme derinliği, meme başı yer arasındaki uzaklık, sağ meme başı uzunluğu, sağ meme başı çapı, sol meme başı uzunluğu ve sol meme başı çapı gibi meme ölçülerini, istatistiksel olarak önemli düzeyde etkilediği belirlenmiştir. Benzer şekilde, İvesi koyunlarında da meme tipinin, sağ meme başı uzunluğunu, sağ meme başı çapını, sol meme başı uzunluğunu ve sol meme başı çapını, önemli seviyede etkilediği bildirilmiştir (Şeker ve ark. 2022).

Çalışmada, Karakas koyunlarında belirlenen meme çevresi ölçüsünün, Tuj (Sarı ve ark. 2015) ve Kıvrıcık koyunları (Altınçekiç ve Koyuncu 2011) için bildirilen meme çevresi ölçülerine benzerlik gösterirken, İvesi (İñiguez ve ark. 2009), Morkaraman (Kırmızıbayrak ve ark. 2005) ve Najdi koyunları (Ayadi ve ark. 2014) için bildirilen meme çevresi ölçülerinden daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca bu çalışmada, Karakas koyunlarında belirlenen sağ ve sol meme başı çapı ölçülerinin, İvesi koyunları (Dağ ve Zülkadir 2004) için bildirilene meme başı çapı ölçülerinden daha düşük olduğu, yine Karakas koyunlarında belirlenen meme genişliği ve meme başları arasındaki uzaklık ölçülerinin, İvesi koyunları (Şeker ve ark. 2022) için bildirilen ölçülerden daha düşük olduğu gözlenmiştir.

Bu çalışmada, meme tipinin hem sütün fiziksel özelliklerine hem de kimyasal bileşenlerine önemli bir etkisinin olmadığı ($p>0.05$) belirlenmiştir. Benzer şekilde, İvesi koyunlarında yapılan bir çalışmada da meme tipinin, sütün yoğunluğuna, iletkenliğine ve donma noktasına önemli etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Şeker ve ark. 2022). Doğan ve Boztepe (2012) tarafından Anadolu Merinosu koyunları üzerinde yapılan çalışmada da meme tipinin, sütün iletkenliğine etkisinin önemsiz olduğu belirlenmiştir. Tuj koyunları üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise meme tipinin, sütün yoğunluğuna etkisinin önemsiz olduğu bildirilmiştir (Sarı ve ark. 2015). Ayrıca Anadolu Merinosu, Tuj, Morkaraman ve İvesi koyunları üzerinde yapılan çalışmalarda da (Doğan ve ark. 2013; Sarı

ve ark. 2013; Özyürek 2020), meme tipinin, sütün kimyasal bileşenlerine etkisinin önemli olmadığı bildirilmiştir.

Bu çalışmada, laktasyon süt verimi ile meme çevresi, meme derinliği, meme genişliği, meme başı-yer uzaklığı, sağ meme başı uzunluğu, sol meme başı uzunluğu, sağ meme başı çapı ve sol meme başı çapı arasında negatif düşük korelasyon katsayılarının ($r = -0,01$ ile $-0,22$) olduğu saptanmıştır. Benzer şekilde, laktasyon süt verimi ile süt proteini, yağsız kuru madde ve laktoz arasında da negatif düşük korelasyon katsayılarının ($r = -0,09$ ile $-0,14$) olduğu tespit edilmiştir. Ancak, laktasyon süt verimi ile meme başları arasındaki uzaklık ve süt yağı arasında pozitif düşük korelasyon katsayılarının ($r = 0,01$ ile $0,17$) olduğu belirlenmiştir. Bu korelasyon katsayılarından, Karakas koyunlarında laktasyon süt verimi ile meme ölçüleri ve sütün kimyasal bileşenleri arasında anlamlı bir ilişkinin olmadığı anlaşılmaktadır. Benzer şekilde, İzadifard ve Zamiri (1997), Ghezel koyunlarında süt verimi ile meme ölçüleri arasında anlamlı bir ilişkinin olmadığını bildirmişlerdir. Merkhani (2014) ise laktasyon süt verimi ile meme başı arasındaki uzaklık, meme başı çapıyla ve meme başı uzunluğu arasında pozitif anlamlı bir korelasyon olduğunu bildirmiştir. İñiguez ve ark. (2009) ise meme ölçüleri ile süt proteini veya yağı arasında pozitif önemli bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Aynı şekilde, Ayadi ve ark. (2014) da laktasyon süt verimi ile bazı meme ölçüleri (derinlik, genişlik ve çevre) arasında pozitif korelasyon olduğunu bildirmiştir.

Sonuç olarak, Karakas koyunlarında meme tipinin laktasyon süt verimi ile sütün fiziksel özellikleri ve kimyasal bileşenleri üzerine etkisinin önemsiz olduğu, buna karşılık meme genişliği hariç tüm meme ölçümleri üzerinde anlamlı düzeyde etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca laktasyon süt verimi ile meme ölçüleri ve sütün kimyasal bileşenleri arasında anlamlı bir korelasyon bulunmadığı tespit edilmiştir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

TEŞEKKÜR VE BİLGİLENDİRME

Bu çalışma Hasan DENK isimli yazarın yüksek lisans tezinden özetlenmiştir. Yazarlar, değerli katkılarından dolayı koyun çiftliği sahibi Sayın Nurettin GEÇGİL'e teşekkürlerini sunar.

YAZAR KATKILARI

Fikir/Kavram: HD, OY
Denetleme/Danışmanlık: OY
Veri Toplama ve/veya İşleme: HD
Analiz ve/veya Yorum: HD, OY
Makalenin Yazımı: HD, OY
Eleştirel İnceleme: OY

KAYNAKLAR

- Altınçekiç SO, Koyuncu M (2011). Relationship between udder measurements and the linear scores for udder type traits in Kıvrıcık, Tahirova and Karacabey Merino ewes. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17(1), 71-76.
- Ayadi M, Matar AM, Aljumaah RS, Alshaiikh MA, Abouheif MA (2014). Evolution of udder type, alveolar and cisternal milk compartment during lactation and their relationship with milk yield in Najdi sheep. *Span J Agric Res*, 12(4), 1061-1070.
- Aytekin I, Öztürk A (2012). Turkey's sheep and sheep management. *Arch Zootech*, 15(3), 39-47.

- Barillet F (2007).** Genetic improvement for dairy production in sheep and goats. *Small Rumin Res*, 70(1), 60-75.
- Casu S, Pernazza I, Carta A (2006).** Feasibility of a linear scoring method of udder type for the selection scheme of Sardinian sheep. *J Dairy Sci*, 89(6), 2200-2209.
- Dağ B, Zülkadir U (2004).** Relationships among udder traits and milk production in unimproved Awassi sheep. *J Anim Vet Adv*, 3(11), 730-735.
- Devi I, Mallick PK, Mohapatra A, Shinde AK, Kuma A (2022).** Effect of udder type on milk yield and suckling behaviour of patanwadi lambs. *Indian J Small Rumin*, 28(1), 96-100.
- Doğan S, Aytekin I, Boztepe S (2013).** The relationships between udder types and udder characteristics, milk yield and components in Anatolian Merino sheep. *JOTAF*, 10(2), 58-69.
- Doğan S, Boztepe S (2012).** The relationships among udder types and electrical conductivity and milk colour in Anatolian Merino sheep. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg*, 52(1), 11-19.
- Dzidic A, Kaps M, Bruckmaier RM (2004).** Machine milking of Istrian dairy crossbreed ewes: udder type and milking characteristics. *Small Rumin. Res*, 55(1-3), 183-189.
- Gezginç Ö (2025).** Türkiye’de Hayvancılığın Gelişimi: Sorun Alanları, Fırsatlar ve Politika Öngörülleri. Bulut Z (Ed). Küçükbaş Hayvan Yetiştiriciliğinin Mevcut Durumu ve Geleceği (s. 357-375). TASAV, Ankara.
- Gezginç Ö (2025).** Van ili hayvancılığının mevcut durumu. *Antakya Vet Bil Derg*, 1(1), 40-52.
- Gutiérrez-Gil B, El-Zarei MF, Alvarez L et al. (2008).** Quantitative trait loci underlying udder type traits in dairy sheep. *J Dairy Sci*, 91(9), 3672-3681.
- Ilyas NM, Karakuş F (2020).** The relationship between udder conformation and milk quantity and quality in Iraqi Awassi ewes. *IJENT*, 4(2), 81-92.
- Iñiguez L, Hilali M, Thomas D, Jesry G (2009).** Udder measurements and milk production in two Awassi sheep genotypes and their crosses. *J Dairy Sci*, 92(9), 4613-4620.
- Izadifard J, Zamiri MJ (1997).** Lactation performance of two Iranian fat-tailed sheep breeds. *Small Rumin Res*, 24(2), 69-76.
- James IJ, Osinowo OA (2004).** Changes in udder size and liveweight of West African Dwarf, Red Sokoto and Sahel goats during lactation and their phenotypic relationship with partial daily milk yield. *Niger J Anim Prod*, 31(1), 119-129.
- Kaygısız A, Dağ B (2017).** Effects of udder types and some environmental factors on milk production of improved Awassi Sheep. *KSU J Agric Nat*, 20(4), 344-349.
- Kaymakçı M (2006).** İleri Koyun Yetiştiriciliği. 2. Baskı. Meta Basım Matbaacılık, İzmir.
- Kırmızıbayrak T, Aksoy AR, Saatci M, Tilki M (2005).** Milk yield and udder characteristics in Tuj and Morkaraman ewes and the relationships between them. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 11(1), 11-15.
- Koçak S, Çelikeloglu K, Çelik HA, Bozkurt Z, Tekerli M (2018).** Some lactation traits, somatic cell count and udder characteristics of Pırlak sheep. *Eurasian J Vet Sci*, 34(1), 36-42.
- Kominakis AP, Papavasiliou D, Rogdakis E (2009).** Relationships among udder characteristics, milk yield and non-yield traits in Frizarta dairy sheep. *Small Rumin Res*, 84(1-3), 82-88.
- Kukovics S, Molnár A, Ábrahám M, Németh T, Komlósi I (2006).** Effects of udder traits on the milk yield of sheep. *Arch Tierz*, 49(2), 165-175.
- Legarra A, Ugarte E (2005).** Genetic parameters of udder traits, somatic cell score, and milk yield in Latxa sheep. *J Dairy Sci*, 88(6), 2238-2245.
- Lérias JR, Hernández-Castellano LE, Suárez-Trujillo A et al. (2014).** The mammary gland in small ruminants: major morphological and functional events underlying milk production. *J Dairy Res*, 81(3), 304-318.
- Margetin M, Oravcova M, Apolen D, Milerski, M (2012).** Genetic parameters for udder traits in Slovak dairy sheep and their crosses with specialized breeds. *J Life Sci*, 6(12), 1363-1370.
- Merkhan KY (2014).** Milk traits and their relationship with udder measurements in Awassi ewes. *Iran J Appl Anim Sci*, 4(3), 521-526.
- Milerski M, Ptáček M, Ducháček J et al. (2020).** Analysis of the relationship between milk production, milk composition and morphological udder measurements in Wallachian sheep. *Czech J Anim Sci*, 65(11), 424-430.
- Özbaşer FT, Akçapınar H (2011).** Some production traits of Acıpayam sheep under the Middle Anatolian Conditions. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg*, 51(1), 1-14.
- Özyürek S (2020).** Investigation of relationship between udder type, lactation traits and milk components in Morkaraman and Awassi. *GUSTIJ*, 10(1), 268-274.
- Prpić Z, Vnučec I, Benić M et al. (2020).** Udder shape and milk yield of different sheep breeds. *J Cent Eur Agric*, 21(2), 197-206.
- Sarı M, Yılmaz I, Onk K (2015).** Effects of lactation stage, lactation order and udder types on udder traits and composition of milk in Tuj ewes. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 62(4), 313-318.
- Şeker I, Köseman A, Kul S, Şeker P, Koçyiğit S (2022).** Effect of udder type on udder traits, milk yield and some physicochemical characteristics of milk in Awassi ewes. *J Hellenic Vet Med Soc*, 73(2), 4235-4244.
- SPPS (2020).** IBM SPPS statistics version 21 for Windows. New York, IBM Corp.
- Ünal N, Akçapınar H, Atasoy F, Yakan A, Uğurlu M (2008).** Some udder traits and growth of lambs and phenotypic correlations between those of traits with milking traits and milk production measured by various milk estimation methods in Bafra sheep. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 55(2), 117-124.
- Vrdoljak J, Prpić Z, Samaržija D et al. (2020).** Udder morphology, milk production and udder health in small ruminants. *Mljekarstvo*, 70(2), 75-84.



Investigation of the Effects of *Diplotaenia turcica* Root Extract on Sperm Parameters and Antioxidant Markers in Methotrexate-Administered Rats

Saadet BELHAN^{1,*} Uğur ÖZDEK²

¹ Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Reproduction and Artificial Insemination, 65080, Van, Türkiye

² Van Yüzüncü Yıl University, Vocational School of Health Services, 65080, Van, Türkiye

Received: 19.02.2026

Accepted: 15.04.2026

ABSTRACT

This experimental study was designed to evaluate the potential toxic effects of Methotrexate (MTX), an antineoplastic agent, on sperm parameters and antioxidant defense mechanisms in rats, as well as to assess the protective potential of *Diplotaenia turcica*, an endemic plant species from Turkey. A total of 21 male Wistar albino rats weighing 250–300 g was included in the study and randomly assigned to three groups of seven animals each. The control group received only physiological saline solution. The MTX group was administered a single intraperitoneal dose of 20 mg/kg MTX. In the MTX + *Diplotaenia turcica* root extract group, following MTX injection, the plant extract was given orally at 150 mg/kg daily throughout the study. At the end of the 7-day period, testicular tissues were collected under ketamine anesthesia. Sperm concentration and the percentage of abnormal sperm were assessed using samples obtained from the cauda epididymis, while portions of testicular tissue were used for biochemical analyses, including measurement of malondialdehyde (MDA) levels, glutathione (GSH) content, and catalase (CAT) activity. The results demonstrated that MTX administration significantly impaired sperm parameters, with a notable decrease in sperm concentration and an increase in the percentage of abnormal sperm. Additionally, MTX elevated MDA levels and reduced GSH content and CAT activity. Administration of *Diplotaenia turcica* root extract partially alleviated these adverse effects, contributing to the preservation of testicular tissue integrity. These findings underscore the biomedical potential of endemic plants in supporting reproductive health and protecting against toxic insults.

Keywords: *Diplotaenia turcica* root extract, Catalase, MDA, Methotrexate, Sperm parameters.

ÖZ

Metotreksat Uygulanan Sıçanlarda *Diplotaenia turcica* Kök Ekstraktının Sperm Parametreleri ve Antioksidan Parametreler Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Bu deneysel çalışma, antineoplastik bir ajan olan Metotreksat (MTX)'in sıçanlarda sperm parametreleri ve antioksidan savunma mekanizmaları üzerindeki olası toksik etkilerini, ayrıca Türkiye'ye özgü endemik bir bitki olan *Diplotaenia turcica*'nın koruyucu potansiyelini araştırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, 250–300 g ağırlığında toplam 21 erkek Wistar albino sıçan kullanılmış ve hayvanlar her biri 7 sıçandan oluşan üç gruba ayrılmıştır. Kontrol grubuna yalnızca serum fizyolojik solüsyonu verilmiştir. MTX grubunda hayvanlara tek doz 20 mg/kg intraperitoneal MTX uygulanmıştır. MTX + *Diplotaenia turcica* kök ekstraktı grubunda ise MTX enjeksiyonunu takiben, 150 mg/kg dozunda bitki ekstraktı oral yolla, deney süresince her gün verilmiştir. Yedi günün sonunda, tüm sıçanlardan ketamin anestezisi altında testis dokuları çıkarılmıştır. Kauda epididimisten elde edilen örnekler kullanılarak sperm yoğunluğu ve anormal sperm oranı değerlendirilmiştir; diğer testis dokusu biyokimyasal analizler için ayrılarak malondialdehit (MDA) düzeyi, glutatyon (GSH) miktarı ve katalaz (CAT) aktivitesi ölçülmüştür. Bulgular, MTX uygulamasının sperm parametrelerinde belirgin bozulmalara yol açtığını, özellikle sperm yoğunluğunda anlamlı azalmalara, anormal sperm oranında ise anlamlı artışlara yol açtığını göstermiştir. Bunun yanı sıra MDA düzeyinde artışa ve GSH miktarı ile CAT aktivitesinde azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Ancak *Diplotaenia turcica* kök ekstraktının bu zararlı etkileri kısmen sınırlayarak testiküler doku bütünlüğünün korunmasına katkı sağladığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, endemik bitkilerin üreme sağlığı ve toksisiteye karşı biyomedikal potansiyellerine ışık tutmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Diplotaenia turcica* kök ekstraktı, Katalaz, MDA, Metotreksat, Sperm parametreleri.



INTRODUCTION

Methotrexate (MTX), a folic acid antimetabolite, is widely used in the treatment of various conditions due to its antitumoral, anti-inflammatory, antimicrobial, and immunosuppressive properties (Cole et al. 2006). Despite its established clinical efficacy, the toxic side effects of MTX pose significant limitations for its therapeutic use. Literature reports indicate that MTX can cause adverse effects, particularly in the gastrointestinal system, as well as hepatotoxicity, nephrotoxicity, bone marrow suppression, pulmonary toxicity, and detrimental impacts on the reproductive system (Manna et al. 2023; Wani et al. 2023). Regarding reproductive toxicity, the testicular tissue is a major target organ in males, as the rapid proliferation and division of spermatogenic cells render them highly susceptible to environmental toxins and chemotherapeutic agents (Zhou et al. 2023). MTX-induced testicular toxicity has been shown to involve multiple mechanisms, including oxidative stress, inflammatory responses, and apoptotic cell death (Arafa et al. 2024; Tarmookh et al. 2024).

Diplotaenia turcica, an endemic plant species from Türkiye, was formerly identified as *Diplotaenia cachrydifolia* until it was reclassified as a distinct species in 2011 based on studies by Pimenov and colleagues in the Bitlis–Van–Hakkâri region (Pimenov et al. 2011). Locally referred to as “siyabo,” the plant is recognized for its applications in traditional medicine. Beyond medicinal uses, *Diplotaenia turcica* is commonly incorporated into the production of “herbed cheese” (otlu peynir), a regional specialty. The plant’s root has traditionally been employed to treat various conditions, including diabetes, hypertension, and rheumatic disorders, and it is also used as an antidote for snake and scorpion bites (Kaval et al. 2014; Uce and Tuncturk 2014; Ozdek et al. 2020). Belonging to the Umbelliferae family, *Diplotaenia turcica* shares a lineage with species that have demonstrated diverse biological activities in experimental studies, including antihyperglycemic, hypolipidemic, and antioxidant effects (Razavi et al. 2010; Ahmed et al. 2011; Farkhad et al. 2012; Duran et al. 2015). This taxonomic placement underscores the significance of exploring the potential biological properties of *Diplotaenia turcica*.

The root extract of *Diplotaenia turcica* has been shown to reduce blood glucose levels and promote beta-cell regeneration in streptozotocin-induced diabetic rats by reducing pancreatic oxidative stress and enhancing antioxidant enzyme activities. Its hydroalcoholic extract has exhibited strong antioxidant and anti-Alzheimer effects, which are attributed to its high phenolic and flavonoid content. In addition, the plant has demonstrated antimicrobial activity against various bacterial strains. Green-synthesized copper nanoparticles derived from *Diplotaenia turcica* have also shown significant antioxidant, antimicrobial, and DNA-protective properties (Ozdek 2020; Ozdek et al. 2020; Seckin 2021; Seckin and Meydan 2021).

Investigating natural products that may prevent the adverse effects of MTX on testicular tissue and sperm parameters is of great importance. Evaluating the potential protective effects of the root extract of *Diplotaenia turcica* against MTX-induced oxidative stress and sperm damage may contribute to the development of novel therapeutic approaches aimed at preserving reproductive health and reducing toxicity. Accordingly, this study aims to elucidate the effects of MTX-induced reproductive toxicity on sperm quality and the antioxidant defense system, and to determine the

potential mitigating role of *Diplotaenia turcica* against this damage.

MATERIAL AND METHODS

The study was conducted following the approval of the Local Ethics Committee for Animal Experiments at Van Yuzuncu Yil University (Date: 26/06/2025; Ethics Approval No: 2025/07-12).

Extraction of Plant Material

The roots of *Diplotaenia turcica*, collected during May–June following taxonomic identification, were thoroughly washed with distilled water. Subsequently, the roots were cut into small pieces, shade-dried, and ground into a fine powder using a mechanical grinder. A 100 g portion of the powdered material was macerated in 1000 mL of 96% ethanol for 24 h. Following maceration, the mixture was filtered, and the filtrate was concentrated using a rotary evaporator at 50 °C and 70 rpm. The resulting extract was further dried in a water bath at 40 °C until complete evaporation was achieved (Farkhad et al. 2012).

Animals and Experimental Design

This study was carried out using 21 adult male Wistar albino rats, weighing 250–300 g each. During the experimental period, the rats were maintained in standard cages under standardized laboratory conditions, with ambient temperature regulated at 22±2 °C and a 12-hour light/12-hour dark photoperiod. Cage maintenance was performed on a daily basis, and the animals were provided unrestricted access to standard feed and drinking water throughout the study.

For the experimental setup, the rats were randomly assigned to three groups, each comprising seven animals: Control group: Received only physiological saline solution (0.9% NaCl) throughout the study.

MTX group: Administered a single intraperitoneal dose of 20 mg/kg MTX (Hassanein et al. 2023; Waly et al. 2023; Abbas et al. 2024; Taleahmad et al. 2024; El-Shitany et al. 2025).

MTX + *Diplotaenia turcica* root extract group: Following a single intraperitoneal injection of 20 mg/kg MTX, the animals were given *Diplotaenia turcica* root extract orally at a dose of 150 mg/kg daily for 7 days.

At the end of the experimental period, all animals were fasted for 12 h. Anesthesia was then induced by intraperitoneal administration of ketamine at 75 mg/kg. Under anesthesia, one testis from each rat was excised for biochemical analyses and stored in a deep freezer at -80°C. These samples were used to assess oxidative stress and antioxidant parameters, including MDA levels, GSH content, and CAT activity. The cauda epididymis from the opposite testis was collected for spermatological evaluations.

Semen Collection and Evaluation of Spermatological Parameters

Sperm samples were obtained from the cauda epididymis to evaluate spermatological parameters, following the method described by Aksu et al. (2015). The cauda epididymis was carefully dissected and removed, then placed in 2 mL of sterile physiological saline solution preheated to 37 °C in a sterile Petri dish. Several small incisions were made in the tissue using a sterile scalpel to facilitate the release of spermatozoa into the medium. The preparation was incubated at 37 °C for approximately 15 min to allow sperm to disperse into the solution. The resulting suspension was homogenized and used for

spermatological analyses, including sperm count, motility, and morphology.

Sperm concentration was determined using a slightly modified version of the method described by Sonmez et al. (2005), substituting an Eppendorf tube for the conventional hemocytometer. Briefly, 10 µL of the sperm suspension, prepared by mincing the cauda epididymis in physiological saline, was aspirated with an automatic pipette and transferred into an Eppendorf tube containing 990 µL of Hayem's solution. The tube was vortexed for 15 s, and approximately 10 µL of the diluted suspension was then loaded into the counting chambers of a Thoma hemocytometer (HHH, Germany). The sample was allowed to settle for 5 min to enable sperm sedimentation, after which sperm counting was performed under phase-contrast microscopy at 400× magnification.

The method described by Turk et al. (2008) was used to assess abnormal sperm cells. A drop of the homogenized sperm suspension was placed on a clean, dry slide and spread to form thin smears. After air-drying, the smears were stained with 1% eosin-nigrosin dye. The slides were then examined under a microscope at 400× magnification. For each sample, at least 200 sperm cells were evaluated, and morphological abnormalities in the head, neck, and tail regions were recorded. The proportion of sperm with normal morphology was calculated and compared among the groups.

Evaluation of Biochemical Parameters

In this study, commercial sandwich ELISA kits were used for all biochemical analyses, in accordance with the manufacturers' instructions. The GSH ELISA kit (Cat. No: ELK8577) was used to determine GSH levels, the MDA kit (Cat. No: YLA0029RA) was used to measure MDA levels, and the CAT kit (Cat. No: YLA0123RA) was used to assess CAT activity.

Statistical Analysis

The normality of data distribution was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test. The results were expressed as mean±standard deviation (SD) of the number of observations. Post-hoc power analysis was performed using the observed effect size of the main outcome parameters, demonstrating that the study achieved a statistical power of over 80% at $\alpha=0.05$. Comparisons of group means were performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's multiple range test for post hoc comparisons between groups. The lettering system (a, b, c) used in the tables represents the results of Duncan's test. The level of statistical significance was set at $p<0.05$. All statistical analyses were performed using SPSS Statistics (Version 20.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

Spermatological Findings

As shown in Table 1, sperm concentration was significantly reduced in the MTX administered group compared with the control group ($p<0.001$). In contrast, the group receiving *Diplotaenia turcica* root extract alongside MTX exhibited a significant increase in sperm concentration relative to the MTX only group ($p<0.001$). Examination of sperm morphology indicated that MTX administration impaired sperm structural integrity, leading to a significantly higher proportion of abnormal sperm compared with controls ($p<0.001$). Conversely, co-administration of *Diplotaenia turcica* root extract with

MTX resulted in a significant reduction in the percentage of abnormal sperm ($p<0.001$).

Biochemical Findings

Analysis of the biochemical data presented in Table 2 revealed a significant increase in MDA levels in the MTX administered group compared with the control group ($p<0.001$). In contrast, the group receiving both MTX and *Diplotaenia turcica* root extract exhibited a significant reduction in MDA levels relative to the MTX only group ($p<0.001$). Evaluation of CAT enzyme activity showed a significant decrease in the MTX group compared with controls ($p<0.001$), whereas co-administration of *Diplotaenia turcica* root extract with MTX led to a significant increase in CAT activity ($p<0.001$). Similarly, GSH levels were significantly lower in the MTX group compared with the control group ($p<0.001$), while GSH levels in the MTX+*Diplotaenia turcica* root extract group were significantly higher than in the MTX only group ($p<0.001$).

Table 1: Effects of *Diplotaenia turcica* root extract on sperm parameters in methotrexate-administered rats.

Groups	Sperm Concentration (x10 ⁶)	Abnormal Sperm Rate (%)	P
Control group	96.71 ± 1.49 ^a	10.00±0.81 ^c	0.001
MTX group	58.85 ± 2.91 ^c	45.85±1.57 ^a	0.001
MTX + <i>Diplotaenia turcica</i> root extract group	67.28 ± 1.11 ^b	25.57±1.71 ^b	0.001

Each value is expressed as mean±SD (n=7). $p<0.05$ was considered statistically significant. Different lowercase letters (a, b, c) within the same column indicate statistically significant differences between groups according to Duncan's multiple range post hoc test.

Table 2: Effects of *Diplotaenia turcica* root extract on testicular tissue MDA and GSH levels and CAT enzyme activity in methotrexate administrated rats.

Groups	MDA (nmol/g tissue)	CAT (µg/g tissue)	GSH (µg/g tissue)	P
Control group	4.11 ± 0.04 ^c	1.37 ± 0.05 ^a	18.19 ± 0.52 ^a	0.001
MTX group	10.01 ± 0.68 ^a	0.59 ± 0.05 ^c	7.82 ± 0.20 ^c	0.001
MTX + <i>Diplotaenia turcica</i> root extract group	6.18 ± 0.59 ^b	0.90 ± 0.06 ^b	12.29 ± 0.32 ^b	0.001

Each value is expressed as mean±SD (n=7). $p<0.05$ was considered statistically significant. Different lowercase letters (a, b, c) within the same column indicate statistically significant differences between groups according to Duncan's multiple range post hoc test.

DISCUSSION AND CONCLUSION

Chemotherapeutic agents are recognized not only for their therapeutic benefits but also for their potential to induce toxic side effects across multiple organ systems. Antimetabolite drugs such as MTX, which are widely used, can adversely affect the reproductive system, leading to impaired fertility. This underscores the importance of protective and adjunctive treatment strategies and underscores the need to explore the potential benefits of biologically active compounds derived from natural sources in mitigating such side effects. In this context, *Diplotaenia turcica*, an endemic plant whose pharmacological properties remain incompletely

understood, is believed to offer protective effects against chemotherapy-induced oxidative stress and reproductive dysfunction through its bioactive constituents. The present study experimentally investigated the effects of this plant extract on MTX-induced reproductive damage.

The data obtained in our study indicate that MTX administration has several adverse effects on male reproductive health. Specifically, sperm concentration was significantly reduced in the MTX group compared with the control group ($p < 0.001$), suggesting that MTX exerts toxic effects on testicular tissue, thereby inhibiting spermatogenesis and reducing sperm production. In addition, analysis of sperm morphology revealed a significant increase in the percentage of morphologically abnormal sperm in the MTX administered group ($p < 0.001$), indicating that MTX may cause structural damage to germ cells and disrupt normal sperm development. Previous studies have reported that MTX disrupts cellular architecture in the testes by inducing apoptosis in spermatocytes and spermatids, which compromises the structural integrity of seminiferous tubules and leads to increased production of abnormal sperm (Taleahmad et al. 2024). The deterioration in sperm parameters may also be linked to the susceptibility of polyunsaturated fatty acids in sperm plasma membranes to reactive oxygen species (Rashid and Sil 2015). MTX-induced testicular damage is understood to involve oxidative stress, inflammation, and apoptosis, collectively causing substantial disruption of spermatogenesis (Mansour et al. 2021; Arafa et al. 2024). Our findings regarding sperm parameters are in agreement with previous reports in the literature (Meng et al. 2022; Delkhosh et al. 2024; Kabartan et al. 2025).

The co-administration of *Diplotaenia turcica* root extract with MTX resulted in a significant increase in sperm concentration and a significant reduction in the percentage of morphologically abnormal sperm ($p < 0.001$). These results align with previous findings reported by Belhan et al. (2020) and suggest that *Diplotaenia turcica* root extract has protective effects against MTX induced testicular toxicity. This protective effect is likely mediated by the antioxidant constituents of the extract, which mitigate oxidative damage caused by reactive oxygen species, thereby preserving germ cells and supporting spermatogenesis.

In this study, CAT enzyme activity, as well as GSH and MDA levels, were measured in the testicular tissues of rats from the experimental groups to evaluate oxidative damage and tissue deterioration induced by MTX. The results revealed a significant decrease in CAT activity and GSH levels ($p < 0.001$), along with a pronounced increase in MDA levels ($p < 0.001$) in the MTX administered group. These findings are in agreement with previous studies showing that MTX impairs antioxidant defense systems, leading to the accumulation of reactive oxygen species and increased lipid peroxidation (Waly et al. 2023; Abbas et al. 2024; Taleahmad et al. 2024; El-Shitany et al. 2025; Kabartan et al. 2025). The elevation in MDA levels indicates enhanced oxidative damage to cellular membranes, which may contribute to functional impairments in testicular tissue (Taleahmad et al. 2024).

Moreover, co-administration of *Diplotaenia turcica* root extract with MTX resulted in a significant restoration of CAT activity and GSH levels to near-control values, accompanied by a significant reduction in MDA levels. These findings indicate that *Diplotaenia turcica* enhances endogenous antioxidant defense mechanisms through its

potent antioxidant constituents, thereby markedly attenuating MTX induced oxidative stress. The decrease in lipid peroxidation suggests preservation of cellular membrane integrity and functional improvement in testicular tissue. Overall, the biochemical results of this study demonstrate a protective effect of *Diplotaenia turcica* root extract against MTX induced testicular toxicity, in line with previous biochemical findings reported by Ozdek et al. (2020) in diabetic rats.

In conclusion, this study demonstrated that MTX administration induces significant impairments in sperm parameters and elevates oxidative stress in the testicular tissue of male rats. *Diplotaenia turcica* root extract, due to its antioxidant properties, partially mitigated these adverse effects by preserving sperm concentration, reducing the proportion of abnormal sperm, and supporting testicular antioxidant defense mechanisms. These findings suggest that *Diplotaenia turcica* root extract may serve as a potential protective agent against MTX induced reproductive toxicity. Future studies are warranted to perform detailed chemical analyses of the plant's active components, evaluate different dosage regimens and long-term effects, and assess the feasibility of clinical application in humans. Additionally, investigating the protective effects of *Diplotaenia turcica* root extract against other chemotherapeutic agents beyond MTX will provide further insight into its potential role in therapeutic contexts.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Idea/Concept: SB, UÖ

Supervision/Consultancy: SB

Data Collection and/or Processing: SB

Analysis and/or Interpretation: SB, UÖ

Writing the Article: SB

Critical Review: SB, UÖ

REFERENCES

- Abbas NAT, El-Sayed SS, Abd El-Fatah SS et al. (2024). Mechanistic aspects of ameliorative effects of Eicosapentanoic acid ethyl ester on methotrexate-evoked testiculopathy in rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 397(1), 357-369.
- Ahmed J, Guvenc A, Kucukboyaci N et al. (2011). Total phenolic contents and antioxidant activities of Prangos Lindl (Umbelliferae) species growing in Konya province (Turkey). *Turk J Biol*, 35(3), 353-360.
- Aksu EH, Akman O, Ozkaraca M et al. (2015). Effect of Maclura pomifera extract against cisplatin-induced damage in reproductive system of male rats. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 21(3), 397-403.
- Arafa EAA, Hassanein EHM, Ibrahim NA et al. (2024). Involvement of Nrf2-PPAR- γ signaling in Coenzyme Q10 protecting effect against methotrexate-induced testicular oxidative damage. *Int Immunopharmacol*, 129, 111566.
- Belhan S, Deger Y, Huyut Z et al. (2020). The effects of *Diplotaenia turcica* root extract on sperm parameters and reproductive hormones in streptozotocin induced diabetic rats. *Harran Univ Vet Fak Derg*, 9(2), 112-117.
- Cole PD, Zebala JA, Alcaraz MJ et al. (2006). Pharmacodynamic properties of methotrexate and Aminotrexate during weekly therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*, 57(6), 826-834.
- Delkhosh A, Shabani F, Delashoub M (2024). Experimental accelerating testicular tissue recovery post-methotrexate treatment in rats: A promising role of Sertoli cell-conditioned medium: An experimental study. *Int J Reprod Biomed*, 22(4), 295-304.
- Duran A, Behcet L, Ozturk M (2015). *Diplotaenia bingolensis* (Apiaceae), a new species from east Anatolia, Turkey. *Plant Syst Evol*, 301, 467-478.

- El-Shitany NA, El-Mahdy NA, Waly OM et al. (2025). Rebamipide modulates the miR-29a/SIRT1/FoxO3a and NF- κ B pathways in methotrexate-induced testicular damage. *Eur J Pharmacol*, 1005, 178063.
- Farkhad NK, Farokhi F, Tukmacki A et al. (2012). Hydro-alcoholic extract of the root of *Prangos ferulacea* (L) Lindl can improve serum glucose and lipids in alloxan-induced diabetic rats. *Avicenna J Phytomed*, 2(4), 179-187.
- Hassanein EHM, Mohamed WR, Hussein RM et al. (2023). Edaravone alleviates methotrexate-induced testicular injury in rats: Implications on inflammation, steroidogenesis, and Akt/p53 signaling. *Int Immunopharmacol*, 117, 109969.
- Kabartan E, Cirrik S, Hacıoglu G et al. (2025). Therapeutic potential of alpha-pinene in methotrexate-induced testicular toxicity: Focus on apoptosis, oxidative stress, and inflammatory pathways. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 399(1), 495-505.
- Kaval I, Behcet L, Cakilioglu U (2014). Ethnobotanical study on medicinal plants in Geçitli and its surrounding (Hakkari, Turkey). *J Ethnopharmacol*, 155(1), 171-184.
- Manna K, Khan ZS, Saha M et al. (2023). Manjari Medika grape seed extract protects methotrexate-induced hepatic inflammation: Involvement of NF- κ B/NLRP3 and Nrf2/HO-1 signaling system. *J Inflamm Res*, 16, 467-492.
- Mansour DF, Saleh DO, Ahmed-Farid OA et al. (2021). Ginkgo biloba extract (EGb 761) mitigates methotrexate-induced testicular insult in rats: Targeting oxidative stress, energy deficit and spermatogenesis. *Biomed Pharmacother*, 143, 112201.
- Meng X, Peng L, Xu J et al. (2022). Betaine attenuates chronic restraint stress-induced changes in testicular damage and oxidative stress in male mice. *Reprod Biol Endocrinol*, 20(80), 1-13.
- Ozdek U (2020). The antioxidant and anti-Alzheimer activities of *Diplotaenia turcica* with phytochemical analysis. *Int J Agric Environ Food Sci*, 4(4), 394-399.
- Ozdek U, Yıldırım S, Deger Y (2020). The effect of *Diplotaenia turcica* root extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Turk J Biochem*, 45(2), 213-222.
- Pimenov M, Kljuykov E, Degtareva G (2011). Survey of the genus *Diplotaenia* (Umbelliferae), with description of two new species from Turkey. *Willdenowia*, 41(1), 67-74.
- Rashid K, Sil PC (2015). Curcumin ameliorates testicular damage in diabetic rats by suppressing cellular stress-mediated mitochondria and endoplasmic reticulum-dependent apoptotic death. *Biochim Biophys Acta*, 1852(1), 70-82.
- Razavi SM, Nazemiyeh H, Zarrini G et al. (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Prangos ferulacea* (L) Lindl from Iran. *Nat Prod Res*, 24(6), 530-533.
- Seckin H (2021). Antimicrobial, antioxidant and DNA damage prevention effect of nano-copper particles obtained from *Diplotaenia turcica* plant by green synthesis. *Pol J Environ Stud*, 30, 4187-4194.
- Seckin H, Meydan İ (2021). Investigation of antimicrobial effect of *Diplotaenia turcica* plant growing in Van province. *J Nat Appl Sci East*, 4(1), 1-7.
- Sonmez M, Turk G, Yuce A (2005). The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. *Theriogenology*, 63(7), 2063-2072.
- Taleahmad F, Khalili M, Haddadzadeh-Niri N et al. (2024). Therapeutic potential of diosgenin against methotrexate-induced testicular damage in the rat. *Reprod Biol*, 24(4), 100966.
- Tarmookh SA, El-Sheikh AA, Motawei KHM et al. (2024). Ameliorative effects of thymoquinone against chemotherapy-induced testicular damage in experimental animals: A systematic review. *Malays J Med Sci*, 31(4), 35-49.
- Turk G, Atessahin A, Sonmez M et al. (2008). Improvement of cisplatin-induced injuries to sperm quality, the oxidant-antioxidant system, and the histologic structure of the rat testis by ellagic acid. *Fertil Steril*, 89, 1474-1481.
- Uce I, Tuncurk M (2014). Hakkâri'de doğal olarak yetişen ve yaygın olarak kullanılan bazı yabancı bitkiler. *Biyol Bilim Arast Derg*, 7(2), 21-25.
- Waly OM, El-Mahdy NA, El-Shitany NAE et al. (2023). Protective role of naftidrofuryl against methotrexate-induced testicular damage via the amelioration of the p53/miRNA-29a/CDC42 apoptotic pathway, inflammation, and oxidative stress. *Environ Toxicol Pharmacol*, 98, 104067.
- Wani FA, Ibrahim MA, Ameen SH et al. (2023). Platelet rich plasma and adipose-derived mesenchymal stem cells mitigate methotrexate-induced nephrotoxicity in rat via Nrf2/Ppary/HO-1 and NF- κ B/Keap1/Caspase-3 signaling pathways: Oxidative stress and apoptosis interplay. *Toxics*, 11(5), 398.
- Zhou L, Chen Y, Sun Y et al. (2023). Cadmium induces apoptosis of mouse spermatocytes through JNK activation and disruption of autophagic flux. *Ecotoxicol Environ Saf*, 265, 115505.



Sıçanlarda Lambda-Sihalotrin Kaynaklı Gastrointestinal Hasar Üzerine Karvakrol'ün Etkilerinin İncelenmesi: Apoptoz ve Endoplazmik Retikulum Stresi Yolaklarının Düzenlenmesi

İlyas BOZKURT^{1,*} Ömercan ALAT² Tuba KARAARSLAN² Esra AKTAŞ ŞENOCAK³ Mesut Bünyami HALICI²

¹ Ardahan Üniversitesi, Nihat Delibalta Göle Meslek Yüksekokulu, Eczane Hizmetleri Bölümü, 75700, Ardahan, Türkiye

² Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 25240, Erzurum, Türkiye

³ Atatürk Üniversitesi, Horasan Meslek Yüksekokulu, Veterinerlik ve Laborant Bölümü, 25800, Erzurum, Türkiye

Geliş Tarihi: 23.03.2026

Kabul Tarihi: 18.05.2026

ÖZ

Bu çalışmada, sentetik bir Tip II piretroid olan lambda-sihalotrinin (λ-SHL) sıçanlarda oluşturduğu gastrointestinal hasarın oksidatif stres, apoptoz ve endoplazmik retikulum (ER) stresi ile ilişkili mekanizmaları araştırılmış ve karvakrolün (KRV) bu toksisiteye karşı koruyucu etkileri değerlendirilmiştir. Erkek Sprague-Dawley sıçanlar; sağlıklı kontrol, KRV, λ-SHL, λ-SHL+KRV25 ve λ-SHL+KRV50 olmak üzere beş gruba ayrılarak 21 gün süreyle oral yolla uygulanmıştır. λ-SHL grubunda mide ve bağırsak dokularında malondialdehit (MDA) düzeylerinin anlamlı şekilde arttığı, glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ve glutatyon (GSH) düzeylerinin ise belirgin olarak azaldığı saptanmıştır (p<0.001). Aynı grupta apoptotik sinyal yollarında *Bcl2* ile ilişkili X proteini (*Bax*) / B-hücreli lenfoma 2 (*Bcl2*) oranının pro-apoptotik yönde değiştiği ve *Casp3* aktivasyonunun yükseldiği belirlenmiştir (p<0.001). Ayrıca endoplazmik retikulum (ER) stresi belirteçleri olan aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (*Atf6*), C/EBP homolog proteini (*Chop*) ve protein kinaz RNA benzeri endoplazmik retikulum kinazı (*Perk*) gen ekspresyonlarının anlamlı düzeyde arttığı gözlenmiştir (p<0.001). KRV uygulanan gruplarda, özellikle yüksek doz KRV verilen λ-SHL+KRV50 grubunda, oksidatif stres parametrelerinin bir göstergesi olan MDA seviyelerinin baskılandığı (p<0.001), antioksidan savunma parametrelerinden olan GPx, SOD aktiviteleri ve GSH seviyelerinin ise arttığı tespit edilmiştir (p<0.001). Apoptoz belirteçlerinden olan *Bcl2* gen ekspresyon düzeyinin arttığı, *Bax* ve *Casp3* gen ekspresyon seviyeleri ile ER stresi belirteçlerinin anlamlı şekilde gerilediği tespit edilmiştir (p<0.001). Sadece KRV verilen gruplarda ise incelenen parametreler kontrol ve tedavi gruplarına paralel şekilde seyretmiştir. Sonuç olarak, λ-SHL'nin gastrointestinal dokuda çoklu moleküler mekanizmalar üzerinden hasara yol açtığı, KRV'nin ise bu toksisiteye karşı belirgin ve doza bağlı koruyucu etki gösterdiği ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Endoplazmik retikulum stresi, Gastrointestinal hasar, Karvakrol, Lambda-sihalotrin, Oksidatif stres.

ABSTRACT

Investigation of The Effects of Carvacrol on Lambda-Cyhalothrin-Induced Gastrointestinal Injury in Rats: Modulation of Apoptosis and Endoplasmic Reticulum Stress Pathways

This study investigated the mechanisms associated with oxidative stress, apoptosis, and endoplasmic reticulum (ER) stress in gastrointestinal damage induced by lambda-cyhalothrin (λ-CHL) in rats and evaluated the protective effects of carvacrol (CRV) against this toxicity. Rats were divided into five groups: control, CRV, λ-CHL, λ-CHL+CRV25, and λ-CHL+CRV50, and treatments were administered orally for 21 days. In the λ-CHL group, malondialdehyde (MDA) levels significantly increased, whereas glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), and glutathione (GSH) levels decreased (p<0.001). Additionally, apoptotic signaling pathways were activated by a pro-apoptotic shift in the *Bcl2*-associated X protein (*Bax*) / B-cell lymphoma 2 (*Bcl2*) ratio and increased *Casp3* activation (p<0.001). Moreover, endoplasmic reticulum (ER) stress markers, including activating transcription factor 6 (*Atf6*), C/EBP homologous protein (*Chop*), and protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (*Perk*), were significantly elevated (p<0.001). In the CRV-treated groups, particularly in the λ-CHL+CRV50 group, MDA levels were significantly suppressed (p<0.001), while antioxidant defense parameters such as GPx, SOD activity, and GSH levels were significantly increased (p<0.001). Furthermore, *Bcl2* was elevated, whereas *Bax*, *Casp3*, and ER stress markers were significantly reduced (p<0.001). CRV alone showed patterns similar to the control group. In conclusion, λ-CHL induces gastrointestinal damage through multiple molecular mechanisms involving oxidative stress, apoptosis, and ER stress, whereas CRV exhibits a dose-dependent protective effect against this toxicity.

Keywords: Carvacrol, Endoplasmic reticulum stress, Gastrointestinal injury, Lambda-cyhalothrin, Oxidative stress.



GİRİŞ

Pestisitler, ekosistemler üzerinde ciddi toksik etkilere yol açabilen ve çevreye en yaygın biçimde salınan kimyasal maddeler arasında yer almakta olup, kontrolsüz ve yoğun kullanımları çevresel ve biyolojik risklerin artmasına neden olmaktadır (Garud ve ark. 2024). Son yıllarda, organofosforlu insektisitlerin çevre ve insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri sebebiyle kullanımının kısıtlanması, alternatif insektisit gruplarına yönelimi artırmış ve bu durum sentetik piretroidlerin kullanımında belirgin bir artışa yol açmıştır (Soderlund ve ark. 2002). Piretroidler, piretrin yapılarına dayalı olarak geliştirilen sentetik insektisitler olup, 1970'lerde *Chrysanthemum cinerariifolium* çiçeği özünden türetilmiş ve günümüzde tarım, hayvancılık ve halk sağlığında zararlı böceklerin kontrolünde yaygın olarak kullanılmaktadır (Lopez-Torres ve ark. 2022; Sakr ve Rashad 2023). Günümüzde sentetik piretroidler, dünya genelinde kullanılan insektisitlerin %30'undan fazlasını oluşturmakta olup (Prasanthi ve Rajini 2005), memelilerde görece düşük akut toksisite göstermeleri, çevrede hızlı biyodegradasyona uğramaları ve kalıcı kalıntılar bırakmamaları nedeniyle ekonomik ve çevre açısından avantajlı insektisitler olarak kabul edilmektedir (Kale ve ark. 1999). Bununla birlikte, artan sayıda çalışma piretroidlerin çeşitli metabolik süreçleri etkileyerek insanlarda, evcil hayvanlarda ve balıklarda toksik etkilere neden olduğunu göstermektedir (Adhikari ve ark. 2006). İki tipe ayrılan piretroidlerden Tip I bileşikler akut toksik dozlarda felç, aşırı uyarılabilirlik ve titremeye neden olurken, Tip II piretroidler aşırı duyarlılık, koreoatetoz ve salivasyon ile karakterize toksisiteye yol açmaktadır (Zhang ve ark. 2021). Lambda-sihalotrin (Tip II piretroid insektisit), Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera gibi gruplara karşı etkili geniş bir insektisidal etki spektrumunun yanı sıra, yaprak, pas ve gal akarlarına karşı da akarisidal özellik göstermektedir. Sebzeler, tahıllar ve pamuk gibi tarım ürünlerinde zararlı kontrolünde yaygın olarak kullanılmakta; ayrıca hayvancılıkta, kümes hayvanlarında ve köpeklerde keneler, pireler, bitler ve akarlar gibi dış parazitlerin kontrolünde de tercih edilmektedir (Xu ve ark. 2023). Hedef dışı organizmalar üzerindeki toksisitesinin görece düşük olduğu bildirilse de yaygın kullanımı nedeniyle insan maruziyetinin arttığı vurgulanmaktadır (Fetoui ve ark. 2009). λ-SHL biyolojik zarlarda birikerek oksidatif stres ile enflamatuar yanıtları tetiklediği bildirilmektedir (Turgut ve ark. 2011). Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri (ROS) üretimiyle antioksidan savunma sistemleri arasında dengenin bozulması ile ortaya çıktığı düşünülmektedir (Karaarslan ve ark. 2026). Oral λ-SHL maruziyetinin deneysel çalışmalarda gastrointestinal mikrobiyota kompozisyonunu değiştirebildiği ve bunun da bariyer fonksiyonu ve metabolik süreçlerde olumsuz etkilere yol açabileceği öne sürülmüştür; bu tür etkiler dolaylı olarak gastrointestinal hasarı (GİH) tetikleyebilir (Zheng ve ark. 2024).

Doğal bitki kaynaklı bileşikler, özellikle fenolik bileşenler düşük maliyet, yüksek biyolojik etkinlik ve kolay erişilebilirlik gibi avantajları sayesinde farklı biyolojik mekanizmalar üzerinden toksisiteye karşı koruyucu etkiler gösterebilmekte ve bu nedenle çeşitli patolojik durumların tedavisinde araştırmaların odağı haline gelmektedir (İleriturk ve ark. 2023; Şimşek ve ark. 2023; Bozkurt ve ark. 2024; Kankılıç ve ark. 2024;). Bu kapsamda monoterpenoid yapıda bir fenolik bileşik olan Karvakrol (KRV), genellikle *Lamiaceae* familyasına ait bitkilerde bulunur ve ayrıca kekik, karabiber ve yabani

bergamot esansiyel yağlarından elde edildiği rapor edilmiştir (Aksu ve ark. 2016; Taslimi ve ark. 2017). KRV yaygın olarak aroma maddesi ile gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Zotti ve ark. 2013) ve anti-inflamatuar, antioksidan, anti-tümör, anti-apoptotik ve anti-mikrobiyal etkiler dâhil olmak üzere çok sayıda farmakolojik ile biyolojik aktivitelerinin olduğu belirlenmiştir (Xu ve ark. 2008; Suntres ve ark. 2015; Sharifi-Rad ve ark. 2018). KRV bakımından zengin kekik suyunun, geleneksel olarak mide ekşimesi başta olmak üzere çeşitli gastrointestinal rahatsızlıkların tedavisinde, kan kolesterolü ve glukoz düzeylerinin düşürülmesinde oral yolla kullanıldığı; ayrıca romatizmal ağrılarda haricen analjezik, halk hekimliğinde ise antiseptik ve lokal analjezik amaçlarla uygulandığı rapor edilmiştir (Oliveira ve ark. 2012). Bunun yanı sıra KRV'nin hepatoprotektif ve nefroprotektif etkiler sergilediği (Nafees ve ark. 2013; ES ve ark. 2015) ve mutlak etanol ile asitlendirilmiş etanol ile indüklenen mide lezyonlarını anlamlı düzeyde baskılayarak belirgin bir gastroprotektif etki ortaya koyduğu bildirilmiştir (Oliveira ve ark. 2012). KRV'nin antioksidan etkisinin aromatik halkaya bağlı hidroksil (OH) grubundan kaynaklandığı, anti-enflamatuar etkisinin ise prostaglandin sentezinin inhibisyonu ile ilişkili olduğu; siklooksijenaz-2 (COX-2) aktivitesini baskılayarak interlökin-1β (IL-1β) ve prostaglandin E2 (PGE2) düzeylerini azalttığı gösterilmiştir (Hotta ve ark. 2010; Da Silva Lima ve ark. 2013; Shoorei ve ark. 2019; Somensi ve ark. 2019). OH grubu içeren fenoller ile yapılan bir çalışmada fenol grubunun, hücre içi serbest radikalleri ortadan kaldırarak önemli bir antioksidan görevi görmesi bunu kanıtlayacak nitelikte bir çalışma olduğu belirtilmiştir (Bozkurt ve ark. 2024). Literatürde λ-SHL'nin neden olduğu GİH'e ilişkin çalışmaların sınırlı olduğu, bu hasarın mekanizmasının henüz tam olarak aydınlatılmadığı ve mevcut farmakolojik yaklaşımların yeterli etki göstermediği dikkate alındığında, bu çalışmada λ-SHL'ye bağlı GİH'in biyokimyasal ve moleküler mekanizmalarının araştırılması ve bu toksisiteye karşı daha önce etkileri incelenmemiş olan KRV'nin potansiyel koruyucu rolünün ortaya konulması amaçlanmaktadır.

MATERYAL VE METOT

Deney Hayvanları

Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneyisel Araştırma ve Uygulama Merkezi bünyesinde temin edilen 200–250 g ağırlığındaki yaklaşık 12 haftalık 35 tane erkek Sprague-Dawley sıçan çalışma boyunca kullanılmıştır. Standart laboratuvar şartlarında (45±5% nem, 24±1 °C ve 12 saat aydınlık/karanlık döngüsü ve sınırsız yiyecek ile su verilerek tutuldu.) barındırılmış ve deney öncesinde 7 gün adaptasyon süresi sağlanmıştır. Bu süre boyunca hayvanlara ad-libitum yem ve su verilmiştir. Bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 25.02.2026 tarih ve 2026/2 sayılı, 8 nolu kararı ile onaylanmış olup, tüm deneysel uygulamalar ulusal ve uluslararası etik kurallar çerçevesinde gerçekleştirilmiştir.

Kimyasallar

Çalışmada kullanılan Lambda-Sihalotrin (λ-SHL; CAS No. 91465-08-6) ve Karvakrol (KRV; CAS No. 499-75-2), Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, ABD)'den temin edilmiştir. Mevcut yapılan analizlerde kullanılan bütün kimyasallar analitik saflıkta olup aynı firmadan satın alınmıştır.

Deneyisel uygulamalar

Sıçanlar rastgele seçilerek, her biri yedi hayvandan oluşan beş deney grubuna ayrıldı. λ -SHL dozu (6.23 mg/kg/gün), bu bileşik için sıçanlarda bildirilen oral LD50 değerinin (~56–79 mg/kg) yaklaşık 1/10'una karşılık gelecek şekilde, sub-akut toksisite oluşturmak ancak letal etki göstermemek üzere seçilmiş; bu doz aynı zamanda piretroid kaynaklı sistemik toksisite modellerinde yaygın olarak kullanılan sıçanlarda etkili biçimde uygulanmış doz ile uyumludur. KRV için seçilen 25 ve 50 mg/kg/gün dozları ise literatürde KRV'nin antioksidan, anti-enflamatuar ve sitoprotektif etkilerini ortaya koyan çalışmalarda güvenlik aralığı içinde kalan ve doz-yanıt ilişkisinin değerlendirilmesine olanak tanıyan etkin dozlar olarak tercih edilmiştir (İleritürk ve Kandemir 2023). Deneysel gruplar aşağıdaki şekilde oluşturuldu:

Sağlıklı Kontrol Grubu (Kontrol): Ratlara 21 gün boyunca oral olarak serum fizyolojik çözeltisi uygulandı.

Karvakrol Grubu (KRV): Ratlara 21 gün boyunca gavajla ağızdan 50 mg/kg/vücut ağırlığı olacak şekilde KRV uygulandı.

λ -Sihlotrin Grubu (λ -SHL): Ratlara 21 gün boyunca oral olarak 6.23 mg/kg/vücut ağırlığı λ -SHL uygulandı.

λ -Sihlotrin + Karvakrol25 Grubu (λ -SHL+KRV25): Ratlara 21 gün boyunca oral yolla 25 mg/kg/vücut ağırlığı KRV verildikten 30 dakika sonra 6.23 mg/kg/vücut ağırlığı λ -SHL verildi.

λ -Sihlotrin + Karvakrol50 Grubu (λ -SHL+KRV50): Ratlara 21 gün boyunca gavajla ağızdan 50 mg/kg/vücut ağırlığı olacak şekilde KRV verildikten 30 dakika sonra 6,23 mg/kg/vücut ağırlığı λ -SHL verildi.

Numunelerin Alınması: Son λ -SHL uygulamasından 24 saat sonra (22. gün) ratlar hafif sevofloran anestezisi altında sakrifiye edilerek mide ve bağırsakları alındı. Alınan dokular moleküler ve biyokimyasal analizler için -80 °C'de muhafaza edildi.

Oksidatif Stres Parametrelerinin (MDA, GPx, SOD ve GSH) Ölçümü

Malondialdehit (MDA) ve glutatyon peroksidaz (GPx) ölçümleri Elisa kit ile yapıldı. MDA düzeyleri ve GPx aktivitesi ticari ELISA kitleri kullanılarak üretici firma protokollerine uygun şekilde analiz edildi. Bu amaçla, toz haline getirilmiş mide ve bağırsak örnekleri fosfat tamponlu salin (PBS) içerisinde 1:20 (a/h) oranında seyreltilmiş ve doku homojenizatörü (Qiagen, TissueLyser II) yardımıyla homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar 4 °C'de 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar toplanarak malondialdehit (MDA; Kat No: 201-11-0157), glutatyon Peroksidaz (GPx; Kat No: 201-11-1705), düzeyleri açısından, ilgili ELISA kit üreticilerinin (Sunred Biological Technology, Shanghai, China) protokollerine uygun olarak analiz edilmiştir.

Hazırlanan homojenatta süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi, (Sun ve ark. 1988) tarafından tanımlanan yöntem esas alınarak ölçülmüştür. Bu yöntem, ksantin-ksantin oksidaz sistemi aracılığıyla üretilen süperoksit radikalinin nitroblue tetrazolium (NBT)'u indirgemesi sonucu oluşan renk değişimine dayanmaktadır. Reaksiyon sonunda meydana gelen mavi renkli formazon bileşiği, maksimum absorpsiyon gösterdiği dalga boyu 560 nm'dir. Formazonun 560 nm'de ölçülen absorpsiyon değerleri kullanılarak SOD aktivitesi hesaplanmıştır.

Hazırlanacak homojenatta glutatyon (GSH) düzeyinin ölçümü (Sedlak ve Lindsay 1968) bildirdiği metoda göre yapıldı. Bu yöntemde göre DTNB [5,5'-Ditiyobis (2-

nitrobenzoik) asit], sülfidril grubuna sahip bileşikler tarafından indirgenerek meydana gelen sarı renk spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda ölçüldü. Sonuçlar, GSH için standart grafik çizildikten sonra ekstrapolasyon yöntemi ile hesaplandı.

Real Time -PCR Analizleri

Aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (*Atf6*), C/EBP homolog proteini (*Chop*) ve protein kinaz RNA benzeri endoplazmik retikulum kinazı (*Perk*), *Bcl2* ile ilişkili X proteini (*Bax*), B-hücreli lenfoma 2 (*Bcl2*) ve sistein-aspartik asit proteaz 3 (*Casp3*) genlerine ait primerler, NCBI'de yer alan Primer-BLAST aracı kullanılarak tasarlanmıştır. Dokular homojenize edildikten sonra, toplam RNA izolasyonu üretici firmanın talimatları doğrultusunda QIAzol Lizis Reaktif (Qiagen, Kat. No. 79306) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı NanoDrop spektrofotometresi (BioTek Epoch) ile değerlendirilmiştir. Toplam RNA'dan cDNA sentezi, RT2 First Strand Kiti (Qiagen, Kat. No. 330404) kullanılarak yapılmıştır. Kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) analizi, RT2 SYBR® Green qPCR Mastermix (Qiagen, Kat. No. 330500) ve gene özgü primerler kullanılarak Rotor-Gene Q Serisi Yazılımı 2.3.1 (Qiagen, Almanya) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Göreceli gen ekspresyon düzeylerinin hesaplanmasında, iç kontrol olarak β -aktin kullanılarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi uygulanmıştır. Tasarlanan primer dizileri Tablo 1'de sunulmuştur (Livak ve Schmittgen, 2001; Bolat ve ark. 2025).

Tablo 1: İlgili genlere ait primer dizilimleri.

Table 1: Primer sequences of the related genes.

Gen / Gene	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')	Uzunluk (bp)	Accession No.
<i>Atf6</i>	TCAACTCAGCA CGTTCCTGA	GACCAGTGAC AGGCTTCTCT	130	NM_00110 7196.1
<i>Perk</i>	GATGCCGAGAA TCATGGGAA	AGATTCGAGA AGGGACTCCA	198	NM_03159 9.2
<i>Chop</i>	GAAGCCTGGTA TGAGGATCT	GAAGTCTGAC TGGAATCTGG	209	NM_00110 9986.1
<i>Casp3</i>	ACTGGAATGTC AGCTCGCAA	GCACTAGTCG CCTCTGAAGA	270	NM_01292 2.2
<i>Bax</i>	TTTCATCCAGG ATCGAGCAG	AATCATCCTC TGCAGCTCCA	154	NM_01705 9.2
<i>Bcl2</i>	GACTTTGCAGA GATGTCCAG	TCAGGTACTC AGTCATCCAC	214	NM_01699 3.2
<i>Actb</i>	CAGCCTTCCTT CTTGGGTATG	AGCTCAGTAA CAGTCCGCCT	360	NM_03114 4.3

Atf6: Activating Transcription Factor 6; **Perk:** Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 3; **Chop:** DNA Damage Inducible Transcript 3; **Casp3:** Caspase-3; **Bax:** Bcl-2-Associated X Protein; **Bcl2:** B-Cell Lymphoma 2; **Actb:** Beta-Actin (β -Aktin, iç kontrol / endogenous reference); **bp:** baz çifti / base pair.

İstatistiksel Analizler

Örneklem büyüklüğü için güç analizi yapıldı; $\alpha=0.05$ ve güç $(1-\beta)=0.80$ hedeflenmiştir; her grupta $n=7$ grupta elde edilen post-hoc güç 0.86 olarak hesaplanmıştır. Güç analizi için Dhouibi ve ark. (2021) çalışması referans olarak alındı. Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS (Sürüm 22.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmadaki örnek sayısı 50'den az olduğundan, verilerin normal dağılım gösterip göstermediğini belirlemek için Shapiro-Wilk testi

kullanıldı. Test sonucunda, belirteçler için $p > 0.05$ değeri elde edildi. Tüm değişkenler normal dağılım gösterdiği için gruplar arasındaki farklılıklar tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile incelenmiş, gruplar arası karşılaştırmalar için Post Hoc test olarak Tukey testi kullanıldı. Tüm veriler ortalama $\pm$ standart sapma (mean $\pm$ SD) şeklinde sunulmuştur. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ olarak kabul edilmiş ve p değerleri virgülden sonra üç basamaklı olacak şekilde raporlanmıştır.

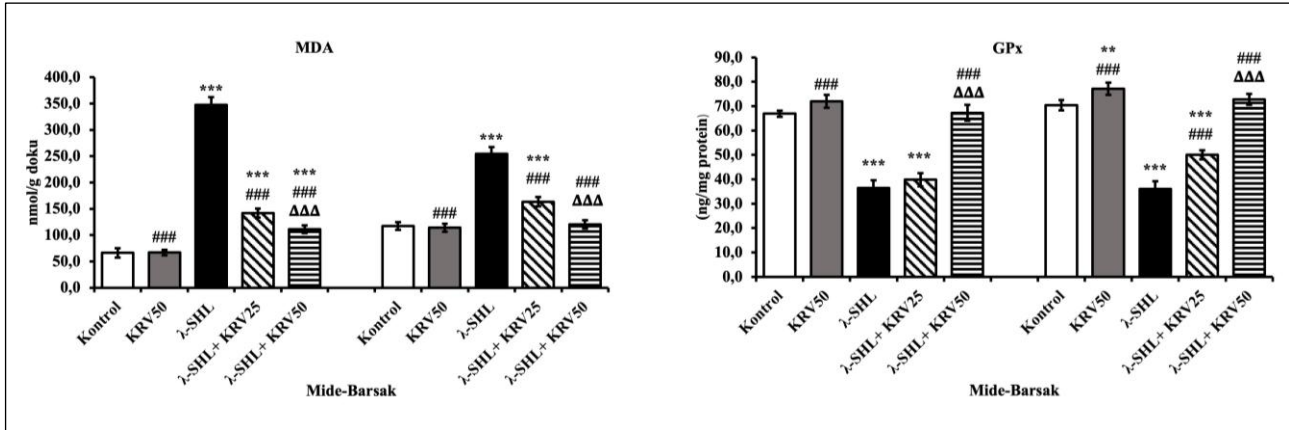
BULGULAR

Oksidatif Stres Parametrelerinin Sonuçları

λ -SHL uygulamasının, lipid peroksidasyonunu artırması sonucu gastrointestinal dokularda MDA düzeyleri istatistiksel açıdan arttığı belirlenmiştir ($p < 0.001$). Kontrol grubu ile λ -SHL+KRV25 ve λ -SHL+KRV50 grupları karşılaştırıldığında mide dokusunda istatistiksel bir fark varken ($p < 0.001$), bağırsak dokusunda sadece λ -SHL+KRV25 grubuyla anlamlı fark olduğu ($p < 0.001$) ve λ -SHL+KRV50 grubuyla anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Mide ve bağırsak dokularında, λ -SHL grubu ile

kıyaslandığında λ -SHL+KRV25, λ -SHL+KRV50 ve KRV50 tedavi gruplarında MDA düzeylerinde azalma olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.001$). Mide ve bağırsak dokularında her iki tedavi grubunda da MDA düzeyleri düştüğü belirlenmiş ancak λ -SHL+KRV50 tedavi grubundaki düşüş dramatik bir şekilde daha çoktur ($p < 0.001$) (Şekil 1).

λ -SHL uygulaması kontrol grubuna kıyasla GPx seviyelerinde önemli derecede azalmaya sebep olmuştur ($p < 0.001$). Bu düşüş, her iki dokuda da önemli bir oksidatif stres oluştuğunu ve mevcut antioksidan enzimlerin serbest radikalleri nötralize ederken tükendiğini göstermektedir. Mide dokusunda, λ -SHL uygulanan grup ile karşılaştırıldığında GPx seviyelerinde λ -SHL+KRV25 ile anlamlı bir fark olmadığı ve λ -SHL+KRV50 ($p < 0.001$) ile anlamlı bir değişiklik olduğu tespit edilmiştir. Bağırsak dokusunda, λ -SHL uygulanan grup ile karşılaştırıldığında GPx seviyelerinde hem λ -SHL+KRV25 grubunda hem de λ -SHL+KRV50 grubunda anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.001$). λ -SHL+KRV25 ve λ -SHL+KRV50 tedavi grupları arasında istatistiksel açıdan her iki dokuda da anlamlı fark olduğu belirlenmiştir ($p < 0.001$) (Şekil 1).

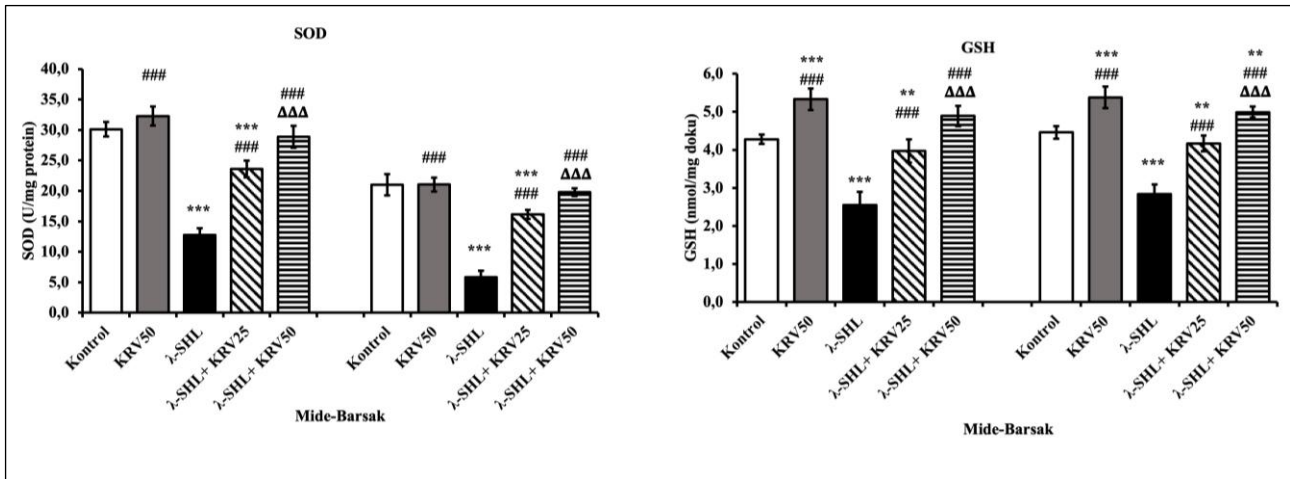


Şekil 1: λ -SHL ile indüklenen GİH üzerine KRV'nin gastrointestinal dokularda oksidatif hasarın göstergesi olan MDA ve GPx üzerine etkisi. Her gruptaki sıçanlara ait veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) ($n = 7$) olarak belirtilmiştir. Tek Yönlü ANOVA ve Tukey Post Hoc testi kullanılarak analiz edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık (kontrol vs. diğerleri: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; λ -SHL vs. diğerleri: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$; λ -SHL+KRV25 ve λ -SHL+KRV50: $\Delta p < 0.05$, $\Delta\Delta p < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta p < 0.001$).

Figure 1: The effect of KRV on MDA and GPx, which are indicators of oxidative damage, in gastrointestinal tissue in the λ -SHL-induced GID. Data for the rats in each group are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) ($n = 7$). Analysis was performed using One-Way ANOVA and Tukey Post Hoc test. Statistical significance was defined as follows: (control vs. others: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; λ -SHL vs. others: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$; λ -SHL+KRV25 and λ -SHL+KRV50: $\Delta p < 0.05$, $\Delta\Delta p < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta p < 0.001$).

λ -SHL uygulaması kontrol grubuna kıyasla hem mide hem de bağırsak dokularında SOD seviyelerinde belirgin bir düşüş tespit edilmiştir ($p < 0.001$). Her iki dokuda da λ -SHL uygulanan grup ile karşılaştırıldığında tedavi gruplarında SOD seviyelerinde anlamlı artış olduğu ($p < 0.001$), özellikle mide dokusunda tedavi gruplarında uygulanan KRV ile beraber toksisitenin azaldığı hatta kontrol grubunun seviyesine çıktığı tespit edilmiştir. Bağırsak dokusunda ise yine tedavi gruplarında toksisite azalmış ancak SOD seviyeleri yükselmiş olsa da kontrol grubunun seviyesine çıkmadığı belirlenmiştir (Şekil 2).

GSH seviyeleri incelendiğinde, kontrol grubu değerlerine kıyasla λ -SHL uygulaması ile beraber her iki dokuda da önemli bir düşüş sergilediği saptanmıştır ($p < 0.001$). λ -SHL ile indüklenen gastrointestinal hasar, eş zamanlı KRV tedavisi ile her iki dokuda da geri çevrilmiş özellikle λ -SHL+KRV50 tedavi gruplarında kontrol grubu seviyesine çıktığı ayrıca bağırsakta bu seviye kontrol grubu seviyesini daha çok geçtiği tespit edilmiştir ($p = 0.007$). Tedavi grupları değerlendirildiğinde, her iki dokuda da yüksek doz KRV grubundaki iyileşmenin düşük doz grubuna göre daha belirgin olduğu gözlenmiştir ($p < 0.001$) (Şekil 2).



Şekil 2: λ-SHL ile indüklenen GİH üzerine KRV'nin gastrointestinal dokularda oksidatif hasarın göstergesi olan SOD ve GSH üzerine etkisi. Her gruptaki sıçanlara ait veriler ortalama ± standart sapma (SD) (n=7) olarak belirtilmiştir. Tek Yönlü ANOVA ve Tukey Post Hoc testi kullanılarak analiz edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık (kontrol vs. diğerleri: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; λ-SHL vs. diğerleri: #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001; λ-SHL+KRV25 ve λ-SHL+KRV50: Δp<0.05, ΔΔp<0.01, ΔΔΔp<0.001).

Figure 2: The effect of KRV on SOD, and GSH, which are indicators of oxidative damage, in gastrointestinal tissue in the λ-SHL-induced GID. Data for the rats in each group are expressed as mean ± standard deviation (SD) (n=7). Analysis was performed using One-Way ANOVA and Tukey Post Hoc test. Statistical significance was defined as follows: (control vs. others: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; λ-SHL vs. others: #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001; λ-SHL+KRV25 and λ-SHL+KRV50: Δp<0.05, ΔΔp<0.01, ΔΔΔp<0.001).

Apoptotik Sinyal Yolakları Parametreleri Analiz Sonuçları

λ-SHL uygulaması kontrol grubuna kıyasla hem mide hem de bağırsak dokularında *Bax* gen ekspresyon düzeylerinde belirgin bir artışa neden olmuştur (p<0.001). Bu durum, λ-SHL'nin hücrelerde apoptozu güçlü bir şekilde uyardığını göstermektedir. KRV50 tek başına *Bax* gen ekspresyon seviyelerini kontrolün altına düşürmüştür. λ-SHL ile birlikte uygulandığında (λ-SHL + KRV25/50), doza bağlı olarak *Bax* seviyelerinde anlamlı bir azalma saptanmıştır (p<0.001). Özellikle KRV50 dozu, pro-apoptotik sinyali kontrol seviyelerine yaklaştırmıştır (Şekil 3).

λ-SHL uygulaması kontrol grubuna kıyasla hem mide hem de bağırsak dokularında *Bcl2* gen ekspresyon düzeylerinde ciddi bir azalmaya sebep olmuştur (p<0.001). Bu durum hücrenin savunma mekanizmasının zayıfladığına işaret eder. KRV50 uygulaması, *Bcl2* gen ekspresyon seviyelerini bazal seviyenin üzerine çıkararak hücre koruyucu etkisini göstermiştir. λ-SHL'nin neden olduğu düşüş, KRV ilavesiyle anlamlı şekilde geri döndürülmüştür. λ-SHL + KRV50 grubunda *Bcl2* gen ekspresyon seviyeleri, kontrol grubunun bile üzerine çıkmıştır (p<0.001) (Şekil 3).

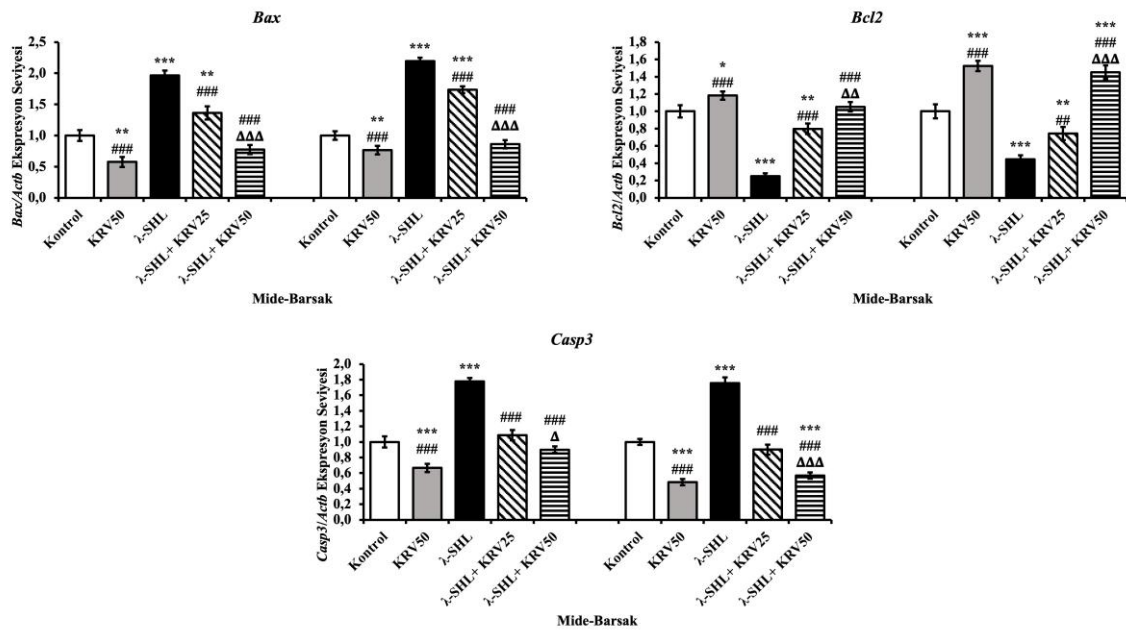
Apoptozun ana yürütücü enzimi olan *Casp3* seviyeleri, λ-SHL uygulanan mide ve bağırsak dokularında en yüksek seviyeye ulaşmıştır (p<0.001). Her iki dokuda KRV uygulaması, λ-SHL tarafından tetiklenen *Casp3* aktivasyonunu doz bağımlı olarak baskılamıştır (p<0.001). Özellikle 50 mg/kg (KRV50) dozunun kombinasyonu, enzimatik aktiviteyi kontrol değerlerine kadar minimize etmiştir. Her iki tedavi grubu birbirleri ile kıyaslandığında midede (p=0.016) ve bağırsakta (p<0.001) anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3).

ER Stresi Parametreleri Analiz Sonuçları

Gastrointestinal dokularda *Atf6* gen ekspresyonu düzeyi, kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak artış meydana gelmiştir (p<0.001). Bu durum, λ-SHL'nin ER lümeninde yanlış katlanmış protein birikimine bağlı olarak katlanmamış protein yanıtı (UPR) yanıtını etkinleştirdiğini kanıtlamaktadır. λ-SHL ile birlikte uygulanan KRV (25 ve 50 mg/kg), *Atf6* gen ekspresyon seviyelerini doza bağlı olarak düşürmüştür. Özellikle λ-SHL + KRV50 grubunda, *Atf6* seviyeleri λ-SHL grubuna göre çok daha düşük seviyelerde saptanmıştır (p<0.001). Her iki tedavi grubu birbirleri ile kıyaslandığında midede (p=0.001) ve bağırsakta (p=0.011) anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4).

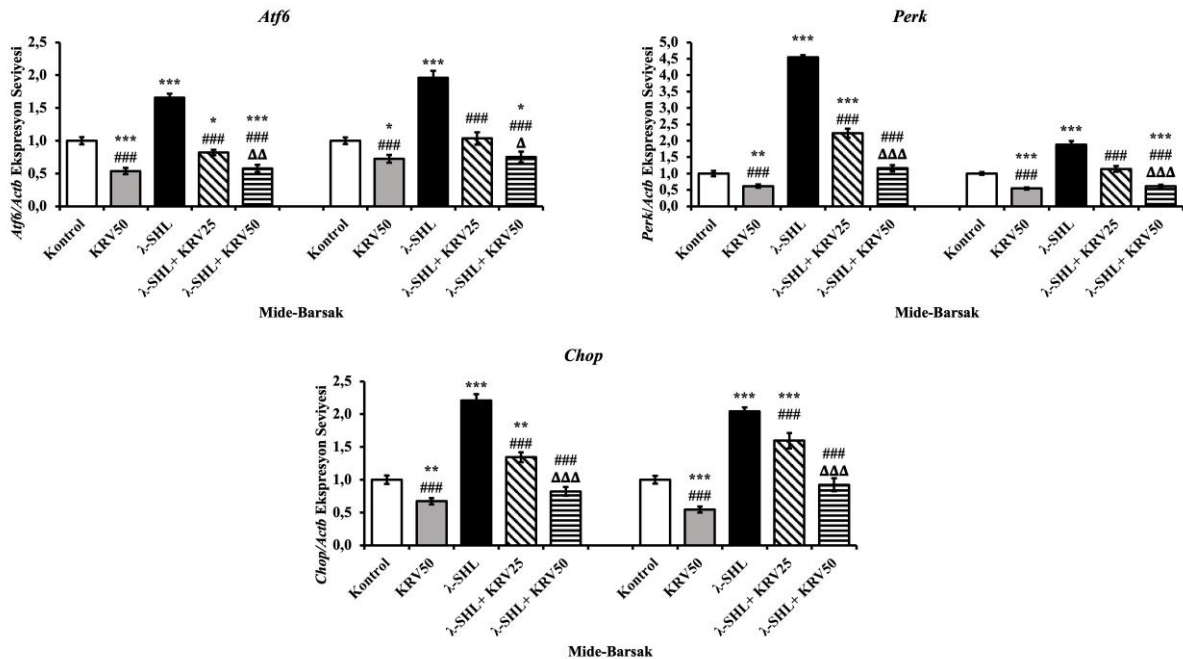
ER stresinin en kritik sensörlerinden biri olan *Perk* gen ekspresyonu seviyeleri, λ-SHL grubunda kontrol grubunun yaklaşık 4.5 katına (mide) ve 2 katına (bağırsak) çıkarak en yüksek değerine ulaşmıştır (p<0.001). KRV ilavesi, *Perk* aktivasyonunu güçlü bir şekilde inhibe etmiştir (p<0.001). λ-SHL + KRV50 kombinasyonu uygulanan gruplarda *Perk* ekspresyonu, kontrol değerlerine oldukça yakın seviyelere gerilemiştir (p<0.001) (Şekil 4).

ER stresine bağlı apoptozun ana aracısı olan *Chop* gen ekspresyonu seviyeleri, λ-SHL uygulanan tüm dokularda keskin bir şekilde artmıştır (p<0.001). Bu artış, ER stresinin şiddetli olduğunu ve hücreyi ölüme (apoptoz) sürüklediğini göstermektedir. KRV uygulaması, *Chop* ekspresyonunu önemli ölçüde baskılayarak (p<0.001) λ-SHL'nin neden olduğu pro-apoptotik ER stresi sinyallerini zayıflatmıştır. KRV50 dozunun etkisi, KRV25 dozuna göre daha belirgin bulunmuştur (p<0.001) (Şekil 4).



Şekil 3: λ-SHL ile indüklenen GİH modelinde KRV'nin gastrointestinal dokularda apoptotik sinyal yollarının (*Bax*, *Bcl2* ve *Casp3*) gen ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. Her gruptaki sıçanlara ait veriler ortalama ± standart sapma (SD) (n=7) olarak ifade edilmiştir. Tek Yönlü ANOVA ve Tukey Post Hoc testi kullanılarak analiz edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık (kontrol vs. diğerleri: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; λ-SHL vs. diğerleri: #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001; λ-SHL+KRV25 ve λ-SHL+KRV50: Δp<0.05, ΔΔp<0.01, ΔΔΔp<0.001).

Figure 3: The effect of KRV on the gene expression levels of apoptotic signaling pathways (*Bax*, *Bcl2*, and *Casp3*) in gastrointestinal tissue in the λ-SHL-induced GID model. Data for the rats in each group are expressed as mean ± standard deviation (SD) (n=7). Analysis was performed using One-Way ANOVA and Tukey Post Hoc test. Statistical significance was defined as follows: (control vs. others: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; λ-SHL vs. others: #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001; λ-SHL+KRV25 and λ-SHL+KRV50: Δp<0.05, ΔΔp<0.01, ΔΔΔp<0.001).



Şekil 4: λ-SHL ile indüklenen GİH modelinde KRV'nin gastrointestinal dokularda ER stresi belirteçlerinin (*Atf6*, *Perk* ve *Chop*) gen ekspresyon düzeyleri üzerinde etkisi. Her gruptaki sıçanlara ait veriler ortalama ± standart sapma (SD) (n=7) olarak ifade edilmiştir. Tek Yönlü ANOVA ve Tukey Post Hoc testi kullanılarak analiz edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık (kontrol vs. diğerleri: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; λ-SHL vs. diğerleri: #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001; λ-SHL+KRV25 ve λ-SHL+KRV50: Δp<0.05, ΔΔp<0.01, ΔΔΔp<0.001).

Figure 4: The effect of KRV on the gene expression levels of endoplasmic reticulum stress markers (*Atf6*, *Perk*, and *Chop*) in gastrointestinal tissue in the λ-SHL-induced GID model. Data for the rats in each group are expressed as mean ± standard deviation (SD) (n=7). Analysis was performed using One-Way ANOVA and Tukey Post Hoc test. Statistical significance was defined as follows: (control vs. others: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; λ-SHL vs. others: #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001; λ-SHL+KRV25 and λ-SHL+KRV50: Δp<0.05, ΔΔp<0.01, ΔΔΔp<0.001).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada λ -SHL uygulaması, gastrointestinal dokularda lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA'nın arttığını ve antioksidan savunma sistemleri olan SOD, GSH ve GPx'in baskıldığını göstermiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, KRV uygulamasının lipid peroksidasyonunu baskılayarak ve antioksidan savunma sistemini güçlendirerek λ -SHL kaynaklı gastrointestinal hasarı azalttığı tespit edilmiştir. Bu bulgular, sentetik piretroidlerin hedef dışı dokularda ROS üretimini artırarak oksidatif hasara yol açtığını bildiren önceki çalışmalarla uyumludur (Kale ve ark. 1999; Fetoui ve ark. 2009). Mevcut güncel çalışmalar, piretroid maruziyetine bağlı oksidatif stresin yalnızca lipid hasarıyla sınırlı kalmayıp hücrel sinyal ağlarını da derinden etkilediğini göstermektedir (Yang ve ark. 2020).

Oksidatif stresin artışına paralel olarak *Bax/Bcl-2* oranının yükselmesi ve *Casp3* aktivasyonunun artması, mitokondriyal apoptotik yolların aktive olduğunu göstermektedir. Apoptozun, ER stresi ile fonksiyonel olarak bağlantılı olduğu ve özellikle *Perk-Chop* ekseninin apoptotik sinyalleşmeyi güçlendirdiği bildirilmektedir (Dogan ve ark. 2023; Fang ve ark. 2024). Bu çalışmada *Perk*, *Atf6* ve *Chop* gen ekspresyonlarının artması, λ -SHL maruziyetinin gastrointestinal dokuda belirgin bir ER stresi yanıtı oluşturduğunu göstermektedir.

Bu bulgular, λ -sihalotrin kaynaklı GIH'de endoplazmik retikulum stresi ile mitokondriyal apoptotik yolak arasında karmaşık bir etkileşim bulunduğunu düşündürmektedir. *Perk* ve *Atf6* yollarının anlamlı düzeyde yukarı regüle edilmesi, λ -sihalotrinin endoplazmik retikulumda protein katlanma homeostazını bozduğunu ve pro-apoptotik transkripsiyon faktörü *Chop*'un aktivasyonuna yol açtığını göstermektedir. ER stresi aracılı bu apoptotik süreç, *Bax/Bcl2* oranındaki artış ve *Casp-3* aktivasyonu ile desteklenmektedir. Mekanistik olarak *Chop*'un kronik aktivasyonu anti-apoptotik *Bcl2* ekspresyonunu baskılayarak, *Bax*'ın mitokondriye translokasyonunu teşvik ederek sitokrom-c salınımını ve ardından kaspaz kaskadının aktivasyonunu tetiklemektedir. Güncel veriler ayrıca ER stresinin bağırsak bariyer bütünlüğünü bozarak inflamasyon ve hücre ölümünü hızlandığını ve GIH'de önemli bir mekanizma haline geldiğini belirtmektedir (Chen ve ark. 2023; Fang ve ark. 2024). Ayrıca λ -SHL'nin bağırsak mikrobiyota kompozisyonunu ve safra asidi metabolizmasını değiştirdiği, bunun da gastrointestinal hasarı dolaylı olarak şiddetlendirebildiği gösterilmiştir (Zheng ve ark. 2024).

KRV uygulaması ise özellikle yüksek dozda oksidatif stres belirteçlerini baskılamış, apoptoz ve ER stresi parametrelerini anlamlı şekilde azaltmıştır. Bu durum, KRV'nin yalnızca antioksidan özellikleriyle değil aynı zamanda UPR sensörlerini modüle ederek sitoprotektif etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Nitekim KRV uygulaması *Perk* ve *Atf6* ekspresyonunu baskılayarak hücrel stres yanıtını sınırlamış ve *Chop* aracılı terminal apoptoza geçişi azaltmış görünmektedir. Son dönem çalışmaları da KRV'nin λ -SHL kaynaklı toksisiteyi antioksidan savunmayı güçlendirmenin yanı sıra apoptoz ve ER stresi yollarını birlikte modüle ederek azalttığını göstermektedir (Kandemir ve ark. 2025). Ayrıca KRV'nin bağırsak epitelinde oksidatif stres koşullarında hücrel dayanıklılığı artırdığı ve bariyer fonksiyonunu koruduğu bildirilmektedir (Hsu ve ark. 2025).

Mevcut çalışmanın güçlü yönlerinin yanı sıra, bulgularının yorumlanmasında göz önünde bulundurulması gereken

bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır. Birincisi, çalışmamızda endoplazmik retikulum stresi (*Atf-6*, *Perk*, *Chop*) ve apoptotik sinyalleşme (*Bax*, *Bcl2*, *Casp3*) yollarına ait belirteçler yalnızca mRNA düzeyinde değerlendirilmiş, protein düzeyinde Western Blot veya immünohistokimyasal (İHK) yöntemlerle doğrulama yapılmamıştır. Transkripsiyonel düzenlenmenin protein ekspresyonuna her zaman doğrudan yansımayaabileceği ve post-transkripsiyonel mekanizmaların ER stresi ve apoptoz proteinlerinin nihai aktivitesinde belirleyici rol oynayabileceği bilinmektedir. Bu nedenle, gen ekspresyon profili ile gözlenen değişikliklerin protein düzeyinde de doğrulanması, KRV'nin koruyucu etkisinin moleküler mekanizmasının daha güçlü biçimde ortaya konulabilmesi açısından önem taşımaktadır. İkinci olarak, çalışmamızda gastrointestinal hasar oksidatif stres, ER stresi ve apoptoz parametreleri üzerinden moleküler ve biyokimyasal düzeyde kapsamlı şekilde değerlendirilmiş; ancak doku düzeyindeki mikroskobik hasarın ortaya konulmasını sağlayacak histopatolojik incelemeler yapılmamıştır. Villus boyu kısalması, kript hasarı, mukozal bütünlüğün bozulması ve enflamatuvar hücre infiltrasyonu gibi yapısal değişikliklerin değerlendirilmemiş olması, λ -SHL kaynaklı doku hasarının ve KRV'nin koruyucu etkinliğinin morfolojik düzeyde objektif olarak skorlanmasına olanak tanımamıştır. Bu durum, biyokimyasal bulguların yorumlanmasında bir kısıtlılık oluşturmaktadır. Sonraki çalışmalarda, mevcut moleküler bulguların Western Blot ve İHK gibi protein düzeyi analizleri ile desteklenmesi, ayrıca rutin histopatolojik değerlendirme ve TUNEL gibi in situ apoptoz tespit yöntemlerinin kullanılması, KRV'nin λ -SHL toksisitesine karşı sergilediği gastroprotektif etkinin bütüncül biçimde ortaya konulmasına önemli katkı sağlayacaktır.

Sonuç olarak, bu çalışma λ -SHL'nin gastrointestinal dokuda oluşturduğu toksisitenin oksidatif stres, ER stresi ve buna bağlı gelişen apoptotik sinyalleşme yolları ile yakından ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Elde edilen bulgular, λ -SHL maruziyetinin özellikle *Perk* ve *Atf6* sinyal yollarını aktive ederek hücre içi protein katlanma homeostazını bozduğunu ve bunun sonucunda pro-apoptotik bir transkripsiyon faktörü olan *Chop* düzeylerinde belirgin artışa yol açtığını göstermiştir. Artan *Chop* ekspresyonu ile birlikte *Bax/Bcl2* dengesinin apoptotik yönde değişmesi ve *Casp3* aktivasyonunun tetiklenmesiyle beraber ER stresinin geri dönüşsüz özellik kazanmasından dolayı hücre ölümünün başladığını doğrulamaktadır. Bununla birlikte, doğal bir fenolik bileşik olan KRV uygulamasının bu patolojik süreçleri doza bağlı olarak anlamlı şekilde baskıladığı belirlenmiş; özellikle 50 mg/kg dozunda KRV'nin pro-apoptotik belirteçleri (*Bax*, *Casp3* ve *Chop*) azaltırken anti-apoptotik *Bcl2* düzeylerini koruduğu ve antioksidan savunma sistemini yeniden dengeleyerek gastrointestinal dokuda belirgin bir sitoprotektif etki oluşturduğu saptanmıştır. Bu bulgular, KRV'nin yalnızca güçlü bir antioksidan değil, aynı zamanda ER stres yanıtlarını modüle edebilen potansiyel bir farmakolojik ajan olduğunu ve piretroid kaynaklı gastrointestinal hasarın önlenmesinde umut verici bir doğal koruyucu strateji sunabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, bu koruyucu etkinin moleküler düzeydeki mekanizmalarının daha ayrıntılı biçimde ortaya konabilmesi için gelecekte yapılacak çalışmaların uzun süreli maruziyet modelleri ile desteklenmesi, mekanizmanın klinik düzeyde ne ölçüde aktarılabildiği netleştirilmelidir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

TEŞEKKÜR VE BİLGİLENDİRME

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'na her türlü katkılarından dolayı teşekkürlerimizi sunarız.

YAZAR KATKILARI

Fikir/Kavram: İB, MBH
Denetleme/Danışmanlık: İB, MBH
Veri Toplama ve/veya İşleme: İB, TK, EAŞ
Analiz ve/veya Yorum: İB, ÖA, TK
Makalenin Yazımı: İB, ÖA, TK, EAŞ
Eleştirel İnceleme: MBH

KAYNAKLAR

- Adhikari S, Sarkar B, Chattopadhyay A et al. (2006). Effect of cypermethrin on breeding performance of a freshwater fish, *Labeo rohita* (Hamilton). *Chem Ecol*, 22, 211–218.
- Aksu EH, Kandemir FM, Altun S et al. (2016). Ameliorative effect of carvacrol on cisplatin-induced reproductive damage in male rats. *J Biochem Mol Toxicol*, 30, 513–520.
- Bolat M, Çelebi F, Şengül E et al. (2025). Investigation of the protective effect of beta-caryophyllene against indomethacin-induced gastric ulcer in rats: In vivo and in vitro study. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1–19.
- Bozkurt I, Halici Z, Zirh EB, Palabiyik-Yucelik SS (2024). EGCG alleviates ochratoxin A-induced pyroptosis in rat's kidney by inhibiting NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling pathway. *Food Chem Toxicol*, 182, 115006.
- Chen X, Shi C, He M, Xiong S, Xia X (2023). Endoplasmic reticulum stress: molecular mechanism and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*, 8, 402.
- Da Silva Lima M, Quintans-Júnior LJ, de Santana WA et al. (2013). Anti-inflammatory effects of carvacrol: evidence for a key role of interleukin-10. *Eur J Pharmacol*, 699, 112–117.
- Dhouibi, R, Affes, H, Salem, MB et al. (2021). Protective effect of *Urtica dioica* in induced neurobehavioral changes, nephrotoxicity and hepatotoxicity after chronic exposure to potassium bromate in rats'. *Environ. Pollut.*, 287, p. 117657.
- Dogan T, Onay E, Yildirim BA (2023). Investigation of the effect of *Polygonum cognatum* Meissn. ethanol extract on Bax, Caspase-3, Bcl-2, NF-κB and NRF-2/HO-1 pathways in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, 5(7), 8.
- El-Sayed Em, Abd-Allah Ar, Mansour Am, El-Arabey Aa (2015). Thymol and carvacrol prevent cisplatin-induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rats. *J Biochem Mol Toxicol*, 29, 165–172.
- Fang T, Tian G, Chen D et al. (2024). Endoplasmic reticulum stress contributes to intestinal injury in intrauterine growth restriction newborn piglets. *Animals*, 14(18), 2677.
- Fetoui H, Garoui EM, Zeghal N (2009). Lambda-cyhalothrin-induced biochemical and histopathological changes in the liver of rats: ameliorative effect of ascorbic acid. *Exp Toxicol Pathol*, 61, 189–196.
- Garud A, Pawar S, Patil MS, Kale SR, Patil S (2024). A scientific review of pesticides: Classification, toxicity, health effects, sustainability, and environmental impact. *Cureus*, 16(8), e67945.
- Hotta M, Nakata R, Katsukawa M et al. (2010). Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPARα and γ and suppresses COX-2 expression. *J Lipid Res*, 51, 132–139.
- Hsu MC, Wang HT ve Chen CY (2025). Carvacrol protects intestinal epithelial cells from oxidative stress. *Int J Mol Sci*, 26(8), 3495.
- İleritürk M, Kandemir FM (2023). Carvacrol protects against λ-cyhalothrin-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity by modulating oxidative stress, inflammation, apoptosis, endoplasmic reticulum stress, and autophagy. *Environ Toxicol*, 38(7), 1535–1547.
- İleritürk M, Kandemir O, Akaras N et al. (2023). Hesperidin has a protective effect on paclitaxel-induced testicular toxicity through regulating oxidative stress, apoptosis, inflammation and endoplasmic reticulum stress. *Reprod Toxicol*, 108369.
- Kale M, Rathore N, John S, Bhatnagar D (1999). Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species. *Toxicol Lett*, 105, 197–205.
- Kandemir Ö, İleritürk M, Gür C et al. (2025). Carvacrol coadministration ameliorates lambda-cyhalothrin-induced toxicity. *J Biochem Mol Toxicol*, e70400.
- Kankılıç NA, Şimşek H, Akaras N et al. (2024). Chrysin ameliorates bortezomib-induced nephrotoxicity in rats by reducing oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, inflammatory injury, apoptotic and autophagic cell death. *Food Chem Toxicol*, 190, 114791.
- Karaarslan T, Alat O, Can I et al. (2026). Protocatechuic acid mitigates diazinon-induced lung injury in rats through modulation of oxidative stress, inflammatory, Keap-1/Nrf-2/HO-1 and ER stress-mediated apoptotic pathways. *Iran J Basic Med Sci*, 29(2), 261–270.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. *Methods*, 25(4), 402–408.
- Lopez-Torres B, Ares I, Martínez M et al. (2022). Lambda-cyhalothrin-induced neurotoxicity: alterations in monoaminergic systems and dopaminergic and serotonergic pathways in rat brain. *Food Chem Toxicol*, 169, 113434.
- Nafees S, Ahmad ST, Arjumand W et al. (2013). Carvacrol ameliorates thioacetamide-induced hepatotoxicity by abrogation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in liver of Wistar rats. *Hum Exp Toxicol*, 32, 1292–1304.
- Oliveira IS, da Silva FV, Viana AFS et al. (2012). Gastroprotective activity of carvacrol on experimentally induced gastric lesions in rodents. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 385(9), 899–908.
- Prasanthi K, Rajini P (2005). Fenvalerate-induced oxidative damage in rat tissues and its attenuation by dietary sesame oil. *Food Chem Toxicol*, 43, 299–306.
- Sakr S, Rashad WA (2023). Lambda-cyhalothrin-induced pancreatic toxicity in adult albino rats. *Sci Rep*, 13(1), 11562.
- Sedlak J, Lindsay RH (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*, 25, 192–205.
- Sharifi-Rad M, Varoni EM, Iriti M et al. (2018). Carvacrol and human health: a comprehensive review. *Phytother Res*, 32, 1675–1687.
- Shoorei H, Khaki A, Khaki AA et al. (2019). The ameliorative effect of carvacrol on oxidative stress and germ cell apoptosis in testicular tissue of adult diabetic rats. *Biomed Pharmacother*, 111, 568–578.
- Soderlund DM, Clark JM, Sheets LP et al. (2002). Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, 171, 3–59.
- Somensi N, Rabelo TK, Guimaraes AG et al. (2019). Carvacrol suppresses LPS-induced pro-inflammatory activation in RAW 264.7 macrophages through ERK1/2 and NF-κB pathway. *Int Immunopharmacol*, 75, 105743.
- Sun Y, Oberley LW, Li Y (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*, 34, 497–500.
- Suntres ZE, Coccimiglio J, Alipour M (2015). The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 55, 304–318.
- Şimşek H, Akaras N, Gür C, Küçükler S, Kandemir FM (2023). Beneficial effects of chrysin on cadmium-induced nephrotoxicity in rats: modulating the levels of Nrf2/HO-1, RAGE/NLRP3, and Caspase-3/Bax/Bcl-2 signaling pathways. *Gene*, 979, 147502.
- Taslimi P, Caglayan C, Gulcin İ (2017). The impact of some natural phenolic compounds on carbonic anhydrase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and α-glycosidase enzymes: an antidiabetic, anticholinergic, and antiepileptic study. *J Biochem Mol Toxicol*, 31, e21995.
- Turgut C, Ornek H, Cutright TJ (2011). Determination of pesticide residues in Turkey's table grapes: the effect of integrated pest management, organic farming, and conventional farming. *Environ Monit Assess*, 173, 315–323.
- Xu J, Zhou F, Ji BP, Pei RS, Xu N (2008). The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol*, 47, 174–179.
- Xu X, Yu Y, Ling M et al. (2023). Oxidative stress and mitochondrial damage in lambda-cyhalothrin toxicity: A comprehensive review of antioxidant mechanisms. *Environ Pollut*, 122694.
- Yang C, Lim W, Song G (2020). Mediation of oxidative stress toxicity induced by pyrethroid pesticides in fish. *Gen Comp Endocrinol*, 296, 113541.
- Zhang X, Zhang T, Ren X et al. (2021). Pyrethroid toxicity to the male reproductive system and offspring mediated by oxidative stress: evidence from rodent studies. *Front Endocrinol*, 12, 656106.
- Zheng W, Xu L, Jin M, Wang J, Rietjens IMCM (2024). Effects of lambda-cyhalothrin on gut microbiota and related bile acid metabolism in mice. *J Hazard Mater*, 480, 136417.
- Zotti M, Colaïanna M, Morgese MG et al. (2013). Carvacrol: from ancient flavoring to neuromodulatory agent. *Molecules*, 18, 6161–6172.



Geleneksel El Yapımı Niğde Basma Bidon Tulum Peynirlerinin Karakterizasyonu: Üretim Değişkenlerinin Mikrobiyal Ekosistem Üzerindeki Etkisi

Fulden KARADAL^{1,*} Tuba SAKİN ŞAHİN¹ Cemalettin BAĞCI¹ Nurhan ERTAŞ ONMAZ²

¹ Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Bor Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, 51700, Niğde, Türkiye

² Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, 38280, Kayseri, Türkiye

Geliş Tarihi: 31.03.2026

Kabul Tarihi: 07.07.2026

ÖZ

Geleneksel el yapımı peynirler, üretim teknikleri, hammadde özellikleri ve olgunlaşma koşullarına bağlı olarak karmaşık bir mikrobiyal ekosistem oluşturur. Bu çalışmada, plastik bidonlarda preslenip olgunlaştırılan ve bugüne kadar sistematik olarak karakterize edilmemiş geleneksel Niğde basma bidon tulum peynirlerinden 48 örneğin fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri incelenmiş, Türk Gıda Kodeksi (TGC) kriterlerine uygunlukları değerlendirilmiş, fizikokimyasal parametrelerin mikrobiyal yük üzerine etkisi belirlenmiş ve örnekler Hiyerarşik Kümeleme Analizi (HKA) ile sınıflandırılmıştır. HKA sonuçlarına göre örnekler üç kümeye ayrılmıştır. Küme 1 (n=11), yüksek nem (%54.11±8.71) ve pH (5.58±0.28) ile düşük titre edilebilir asitlik (%0.91±0.27 LA) ile karakterize edilmiş ve yüksek Koagülaz Pozitif Stafilokok (KoPS) seviyeleri (4.41±2.44 log kob/g) göstermiştir. Küme 2 (n=9), en düşük nem (%36.19±4.56) ve kuru maddede en yüksek yağ (%63.92±9.45) içeriği ile mikrobiyal büyümenin kısıtlandığı grup olmuştur. Küme 3 (n=28), örneklerin %58.3'ünü oluşturmuş; düşük pH (4.90±0.34), yüksek asitlik (%2.20±0.39 LA) ve yüksek Laktik Asit Bakterileri (LAB) sayısı (6.55±0.55 log kob/g) ile aktif fermentasyon profili sergilemiştir. Peynirlerde genel olarak biyolojik koruyucu potansiyeli olan LAB türleri baskın olmasına rağmen (6.06±1.38 log kob/g), örneklerin %54.2'sinde ortalama 6.33±0.51 log kob/g düzeyinde tespit edilen KoPS, yetersiz asitifikasyon veya post-proses kontaminasyona işaret etmektedir. Yağsız peynir kitlesindeki nem oranı (PYKN) Ortalama %59.06±9.56 olup, örneklerin %33.3'ü yarı sert, %27.1'i sert olarak sınıflandırılmıştır. Örneklerin %41.7'sinin TGC'nin %45 nem sınırını aştığı, yüksek pH ve nemin Fekal Koliform (FK) ve Toplam Aerob Mezofil Bakteri (TAMB) artışı ile anlamlı ilişkili olduğu tespit edilmiştir (p<0.05). Bulgular, peynir üretiminde geleneksel özellikler korunurken nem, olgunlaşma süreci ve hijyen sağlama aşamalarında kontrolün artırılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: İstatistiksel veri analizi, Kimyasal analiz, Koloni oluşturan birimler yöntemi, Peynir.

ABSTRACT

Characterization of Artisanal Niğde Basma Bidon Tulum Cheeses: Impact of Processing Variables on Microbial Ecosystems

Traditional cheeses represent a complex microbial ecosystem shaped by production techniques, raw material characteristics, and ripening conditions. In this study, the physicochemical and microbiological properties of 48 samples of traditional Niğde pressed and matured cheese locally referred to as "bidon" that had not been systematically characterized to date were examined, their compliance with the Turkish Food Codex (TFC) was evaluated, the effect of physicochemical parameters on microbial load was determined, and the samples were classified using Hierarchical Clustering Analysis (HCA). According to the HCA results, the samples were divided into three distinct clusters. Cluster 1 (n=11) was characterized by high moisture (54.11±8.71%) and pH (5.58±0.28) levels, coupled with elevated Coagulase-positive *Staphylococcus* (CoPS) counts (4.41±2.44 log cfu/g). Cluster 2 (n=9) exhibited restricted microbial growth, featuring the lowest moisture content (36.19 ± 4.56%) and the highest fat content in dry matter (63.92±9.45%). Cluster 3 (n=28), representing 58.3% of the samples, showed an active fermentation profile with low pH (4.90 ± 0.34), high acidity (2.20±0.39% LA), and a dominant Lactic Acid Bacteria (LAB) count (6.55±0.55 log cfu/g). Although LAB species with biological protective potential were dominant (6.06±1.38 log cfu/g), CoPS detected in 54.2% of the samples at an average level of 6.33±0.51 log cfu/g indicates insufficient acidification or post-process contamination. The mean MNFS (Moisture in Non-Fat Substance) was 59.06±9.56%, with 33.3% of the samples classified as semi-hard and 27.1% as hard. It was found that 41.7% of the samples exceeded the 45% moisture limit of the TGC and high pH and humidity were significantly associated with increased Fecal Coliform (FC) and Total Aerobic Mesophilic Bacteria (TAMB) (p<0.05). These findings indicate that stricter control of moisture, ripening conditions, and hygiene practices is essential to ensure safety while preserving traditional characteristics.

Keywords: Cheese, Chemical analysis, Colony forming units assay, Statistical data analysis.



GİRİŞ

Peynir; süt, yağsız süt veya yayıkaltı gibi süt ürünlerinin peynir mayası ya da zararsız organik asitlerle pıhtılaştırılması, oluşan pıhtının suyunun süzülmesi, şekillendirilmesi ve tuzlanmasıyla elde edilen; taze olarak ya da olgunlaştırıldıktan sonra tüketilebilen bir süt ürünüdür. Dayanıklılığı, zengin bileşimi, yüksek besin değeri ve kendine özgü aroması nedeniyle peynir, insan beslenmesinde önemli bir yere sahip olup, en eski gıda fermentasyon ürünlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Mazzocca ve ark. 2024; Alfaki ve ark. 2026). Türkiye’de resmi kaynaklara göre kültürel, ekonomik ve gastronomik alanda önemli rollere sahip olan ve farklı karakteristik özellikler sergileyen 50 civarında özgün peynir çeşidi olduğu belirtilmektedir. Bu peynirlerin üretim süreçleri bölgeye göre farklılık gösterebilmekte; örneğin çiğ sütün laktik asit bakterileriyle (LAB) zenginleştirilmesi amacıyla doğal starter kültürler kullanılmaktadır (Çakmakçı ve ark. 2008; Kamber ve Terzi 2008). Peynirlerin sınıflandırılması ve kalite kriterleri uluslararası ve ulusal gıda kodekslerinde belirtilen çeşitli prensiplere göre yapılmakta; fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri ile ilgili standartlar TGG Peynir Tebliği ve TGG Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği tarafından belirlenmektedir (TGG 2015; TGG 2025).

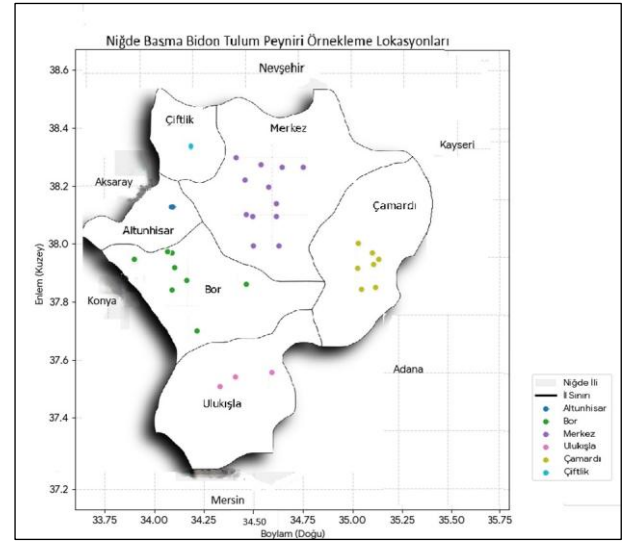
Ülkemizdeki peynirler; pıhtılaştırma yöntemi, olgunlaşma süresi ve yöntemi, tekstür ve yağ oranına göre sınıflandırılmaktadır (Çakmakçı ve ark. 2008). Bu çeşitlerden biri olan tulum peyniri, Orta Anadolu’nun iklim ve coğrafi özelliklerine uygun olarak üretilen geleneksel bir türdür. Tulum peyniri üretiminde pıhtılaştırılan ve süzülen teleme; deri, toprak veya plastik kaplara sıkıca basılarak toprağa gömülme ve anaerobik ortamda olgunlaştırılmaktadır (Kamber ve Terzi 2008; Tekin ve Güler 2021; Çetin ve ark. 2025).

Niğde yöresinde tulum peyniri, sadece inek sütü veya koyun sütü karışımından, kullanılan olgunlaştırma ambalajına bağlı olarak deri tulumu ve basma bidon tulumu olmak üzere iki farklı şekilde üretilmektedir (Çetin ve ark. 2025). Daha önceki çalışmalarda deri, plastik bidon, çömlek gibi materyallerde olgunlaştırılan tulum peynirlerinin kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinin üretiminde kullanılan ambalaj materyali, olgunlaşma koşulları ve çevresel faktörlerden etkilenebildiği; bu durumun ürün kalitesi ve gıda güvenliğinde önemli değişkenliklere yol açabildiği rapor edilmiştir (Hayaloğlu ve ark. 2007; Tarakçı ve Durmuş 2016; Cakir ve Cakmakci 2018).

Literatürde Niğde basma bidon tulum peynirinin gastronomi turizmi potansiyeline yönelik nitel değerlendirmeler bulunmakla birlikte (Çetin ve ark. 2025), bu peynirin fizikokimyasal ve mikrobiyolojik kalite özelliklerinin incelendiği veya TGG’da tanımlanan standart kriterlere uyum düzeyine ilişkin bilimsel veriler oluşturulduğu bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, Niğde yöresinde üretilen ve “basma bidon tulum” olarak adlandırılan geleneksel peynirlerin kimyasal ve mikrobiyolojik kalite özelliklerini karşılaştırmalı olarak belirlemek ve elde edilen bulguların TGG Peynir Tebliği’ne uygunluğunu değerlendirmektir; bu kapsamda çalışma, söz konusu peynirlerin standardizasyonuna katkı sağlamayı ve gıda güvenliği açısından bilimsel bir veri temeli oluşturmayı hedeflemektedir.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada, Kasım 2024 – Şubat 2025 tarihleri arasında Niğde ilinin farklı ilçe, köy ve beldelerinden, termizasyon işlemi uygulanmış sütlerden üretilen (50-60°C) toplam 48 adet basma bidon tulum peyniri temin edildi, soğuk zincir ile laboratuvara getirilerek analiz edildi. Örnekleme alanları ilin farklı coğrafi bölgelerini ve üretim koşullarını temsil edecek şekilde belirlendi, örnekleme noktaları Şekil 1’de sunuldu. Bu kapsamda örnekleme; Merkez (n=19), Çamardı (n=12), Bor (n=11), Ulukışla (n=4), Altunhisar (n=1) ve Çiftlik (n=1) ilçelerinde yer alan toplam 32 farklı yerleşim biriminden gerçekleştirildi (Tablo 1). Peynir örneklerinin temini sırasında üreticilerle görüşüldü ve peynir yapım sürecinin aşamaları genel olarak belirlendi (Şekil 2).



Şekil 1: Niğde basma bidon tulum peynirlerinin örnekleme lokasyonları.

Figure 1: Sampling locations of Niğde basma bidon tulum cheeses.

Tablo 1: Peynir örneklerinin temin edildiği lokasyonlar.

İlçe	Yerleşim Birimi (Köy/Belde)	Örnek Sayısı (n)
Merkez	Kiledere (7), Hasaköy (2), Gümüşler (1), Alay (1), Sazlıca (1), Hançerli (1), İçmeli (1), Çavdarlı (1), Elmalı (1), Yeşilburç (1), Uluağaç (1), Aşlama (1)	19
Çamardı	İlçe Merkezi (5), Bademdere (2), Burç (1), Celaller (1), Çukurbağ (1), Demirkazık (1), Üçkapılı (1)	12
Bor	Kaynarca (4), Bahçeli (1), Halaç (1), Karamahmutlu (1), Badak (1), Kılavuz (1), İncirli (1), Karanlıkdere (1)	11
Ulukışla	Karatepe (1), Çiftehan (2), Hüsniye (1)	4
Çiftlik	Azatlı (1)	1
Altunhisar	Fesleğen (1)	1
TOPLAM	32 Farklı Lokasyon	48



Şekil 2: Niğde basma bidon tulum peynirinin geleneksel üretim süreci.

Figure 2: Traditional production process of Niğde basma bidon tulum cheese.

Mikrobiyolojik Analizler

Peynir örneklerinin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi amacıyla toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB), mezofilik laktik asit bakterileri (LAB), Mikrokok-stafilokok, Koagulaz Pozitif *Staphylococcus* (KoPS), maya ve küf, koliform ve fekal koliform (FK) grubu bakterilerin sayımları gerçekleştirildi. Bu amaçla, her bir peynir örneğinden aseptik koşullarda 25 g alındı ve 225 mL %0.25'lik Ringer çözeltisi (Merck, Almanya) ile homojenize edildi; elde edilen homojenattan 10^{-1} – 10^{-6} aralığında seri ondalık dilüsyonlar hazırlandı. Hazırlanan dilüsyonlardan uygun hacimlerde örnek alınarak, ilgili mikroorganizma gruplarının sayımı için seçici ve/veya diferansiyel besiyerlerine dökme plak veya yayma plak yöntemleriyle ekim yapıldı.

TAMB sayımı için Plate Count Agar'da (PCA, Merck 105463) 30 °C'de 48–72 saat inkübasyon uygulandı, oluşan tüm koloniler değerlendirmeye alındı (ISO 4833 2013). Laktik asit bakterileri (LAB) Man-Rogosa-Sharpe Agar (MRS, Merck 110660) agarda anaerobik koşullarda 30°C'de 48–72 saat inkübasyonla belirlendi, küçük, düzensiz yapılı, kirli beyaz veya krem renkli koloniler sayıldı (ISO 15214 1998). Maya-küf sayımı için pH'ı 3.5'e ayarlanmış Potato Dextrose Agar (PDA, Merck 110130) besiyeri 28 °C'de 5 gün inkübe edildi, tipik koloniler değerlendirildi (Halkman 2005). Mikrokok ve stafilocok sayımı Mannitol Salt Agar (MSA, Merck 105404) besiyerinde 37 °C'de 24–48 saatlik inkübasyonla, KoPS ise yumurta sarısı-tellürit emülsiyonuyla zenginleştirilmiş Baird-Parker Agar (BPA, Merck 105406) besiyerinde 35–37 °C'de 24–48 saatlik inkübasyonla gerçekleştirildi (Kaban ve Kaya 2006; ISO 6888-1 2021). MSA'daki sarı zon oluşturan ve pembe-kırmızı, BPA'daki etrafında karakteristik şeffaf zon (hale) bulunan siyah renkli koloniler sayıldı, şüpheli koloniler koagulaz testiyle doğrulandı. Koliform ve FK bakteriler Violet Red Bile Lactose Agar (VRBL, Merck 101406) besiyerinde dökme plak yöntemiyle, sırasıyla 35 °C ve 44–45 °C'de 24–48 saat inkübe edilerek kırmızı, pembe ve renksiz koloniler sayıldı (ISO 4832 2006). Sonuçlar log kob/g cinsinden ifade edildi; tespit sınırının altındaki değerler 0.5 log kob/g olarak normalize edildi. Metinde ve Tablo 3'te sunulan ortalama mikrobiyal yük değerleri, ilgili mikroorganizmanın tespit edildiği pozitif örnekler üzerinden hesaplandı.

Kimyasal Analizler

Nem ve kuru madde içeriği TS 591 ve TS EN ISO 5534 standartlarına göre 102 ± 2 °C'de sabit ağırlığa gelinceye dek kurutma yöntemiyle belirlendi (TSE 2006). Yağsız peynir kitlesindeki nem oranı (PYKN),

$PYKN = \frac{\text{Nem Miktarı (g)}}{[\text{Toplam Ağırlık (g)} - \text{Yağ Miktarı (g)}]} \times 100$ formülüyle hesaplanarak örnekler TGK peynir tebliğine göre sınıflandırıldı (Guinee ve ark. 2007; TGK 2015).

Yağ içeriği TS 8189 esasına göre Gerber yöntemiyle belirlendi ve sonuçlar kuru maddede yağ olarak ifade edildi (TSE 1990). pH değeri, örneklerin distile su ile 1:1 oranında homojenize edilmesinin ardından pH-metre (Isolab, 422522) ile ölçüldü. Titrasyon asitliği 0,1 N NaOH çözeltisiyle fenolftalein indikatörü kullanılarak titre edildi ve sonuçlar % laktik asit (m/m) cinsinden ifade edildi (TSE 2006; Sayın ve ark. 2025). Tuz içeriği Mohr yöntemiyle belirlenerek kuru maddede tuz bazında da hesaplandı (Sayın ve ark. 2025). Kül tayini gravimetrik yöntemle 550 ± 20 °C'de tam yakma yoluyla gerçekleştirildi (TSE 2006).

İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel değerlendirmesi IBM SPSS Statistics 25 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmaya dahil edilen örneklem büyüklüğü ($n=48$), Niğde iline bağlı altı ilçedeki peynir üreticilerine ulaşılabilirlik durumu temel alınarak belirlendi; önceden güç analizi yapılmadı. Tüm fizikokimyasal ve mikrobiyolojik parametreler için tanımlayıcı istatistikler (ortalama $\pm$ standart sapma, minimum, maksimum) hesaplandı. Veri dağılımının normalliği Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Normal dağılım varsayımının karşılanmadığı tüm parametreler için fizikokimyasal ve mikrobiyolojik değişkenler arasındaki ilişkiler Spearman Rho korelasyon katsayısı (ρ) ile incelendi; anlamlılık eşiği $p < 0.05$ olarak belirlendi.

Örneklerin kümelenmesi amacıyla yedi temel parametre (nem, sertlik/PYKN, pH, titre edilebilir asitlik, TAMB, LAB ve KoPS) seçildi. Tüm değişkenler Z-skorlarıyla standardize edilerek HKA, Ward bağlantı yöntemi ve Kare Öklid Mesafesi kullanılarak uygulandı. Bu analizler ile takip eden Tek Yönlü ANOVA/Welch testlerinde veri setinin bütünlüğünü korumak amacıyla, tespit sınırı altındaki değerler 0.5 log kob/g olarak normalize edilerek tüm veri seti ($n=48$) kullanıldı. Oluşan üç küme arasındaki farklılıkların istatistiksel anlamlılığı, varyans homojenliği Levene testi ile doğrulandıktan sonra homojen varyans durumunda Tek Yönlü ANOVA, homojenliğin sağlanmadığı durumlarda Welch testi ile belirlendi. Post-hoc karşılaştırmalar, varyans homojenliğine bağlı olarak sırasıyla Tukey HSD veya Tamhane T2 testleri ile yapıldı ($p < 0.05$).

BULGULAR

Çalışmada analiz edilen 48 örneğin, TGK Peynir Tebliği'nde belirtilen yağsız kuru maddede nem (PYKN) değerlerine göre yapılan sınıflandırmasında, örneklerin 16'sının (%33.3) yarı sert, 13'ünün (%27.1) sert ve 6'sının (%12.5) ekstra sert olduğu belirlendi. Ayrıca, örneklerin 6'sının (%12.5) yarı yumuşak ve 7'sinin (%14.6) yumuşak peynir grubunda yer aldığı tespit edildi. Peynir örneklerindeki nem seviyeleri değişkenlik gösterdi. Analiz edilen 48 peynir örneğinin 20'sinde (%41.7) nem içeriğinin %45–65 aralığında olduğu belirlendi. Bunu, 15 örnekte (%31.3) %40'ın altında ve 11 örnekte (%22.9) %40–45 aralığında bulunan nem değerleri izledi. En yüksek nem içeriği ise 2 örnekte (%4.2) %65–80 aralığında tespit edildi (Tablo 2).

Kuru maddede yağ içeriğine göre yapılan sınıflandırmada analiz edilen 48 örneğin 28'sinin (%58.3) yarım yağlı, 18'inin (%37.5) tam yağlı ve 2'sinin (%4.2) az yağlı olduğu belirlendi. Tam yağlı örneklerin büyük çoğunluğunun ($n=13$) merkez bölgeden temin edildiği, diğerlerinin ise Çamardı ($n=2$), Ulukışla ($n=1$), Altunhisar ($n=1$) ve Çiftlik ($n=1$) bölgelerinden elde edildiği tespit edildi. Bor bölgesinden toplanan örneklerin tamamının (%100) yarım yağlı olduğu belirlendi. Az yağlı peynirlerin ise Çamardı/Burç ve Ulukışla/Karatepe bölgelerinden temin edildiği görüldü (Tablo 2).

Tablo 2: Niğde basma bidon tulum peyniri örneklerinin ilçe bazlı ortalama fizikokimyasal analiz sonuçları**Table 2:** Average physicochemical analysis results of Niğde basma bidon tulum cheese samples by district.

İlçe	Sertlik (PYKN) (ortalama)	Nem (%) (ortalama)	Kuru Maddede Süt Yağı (%) (ortalama)	Kuru Maddede Tuz (%) (ortalama)	Kül (%) (ortalama)	%Laktik asit (ortalama)	pH (ortalama)
Merkez (n:19)	64.78±9.27	46.67±9.88	52.08±12.9	3.75±0.68	4.67±0.91	1.45±0.63	5.33±0.33
Bor (n:11)	54.39±8.64	43.80±8.72	36.96±4.91	3.19±0.41	4.89±1.30	1.88±0.43	4.95±0.14
Çamardı (n:12)	54.12±7.06	42.02±4.40	37.38±13.01	3.35±0.58	5.98±1.15	2.30±0.61	4.79±0.52
Ulukışla (n:4)	59.82±9.20	48.64±5.46	36.38±11.15	3.56±0.89	3.73±1.02	1.86±0.70	5.39±0.14
Altunhisar (n:1)	63.24	34.15	69.90	2.98	4.30	2.57	4.62
Çiftlik (n:1)	53.80	31.22	61.10	2.85	5.60	1.50	5.38
Toplam (n:48)	59.06±9.56	44.43±8.43	44.19±13.80	3.47±0.64	4.98±1.22	1.81±0.66	5.09±0.42

Tablo 3: İlçelere göre Niğde basma bidon tulum peyniri örneklerinin ortalama mikrobiyal yük (log kob/g) ve pozitiflik oranı n (%) dağılımı**Table 3:** Distribution of mean microbial load (log cfu/g) and positivity rate (n%) of Niğde basma bidon tulum cheese samples by district.

İlçe	TAMB	LAB	KoPS	Mikrokok-Stafilokok	Maya-Küf	Koliform	FK
Merkez (n=19)	5.60±1.01 log kob/g (n=19 %100)	6.07±0.69 log kob/g (n=19 %100)	6.52±0.72 log kob/g (n=8 %42.1)	5.77±1.12 log kob/g (n=8 %42.1)	5.38±0.68 log kob/g (n=9 %47.4)	5.84±0.28 log kob/g (n=3 %15.8)	5.53±0.41 log kob/g (n=3 %15.8)
Çamardı (n=12)	5.97±0.85 log kob/g (n=12 %100)	6.42±0.83 log kob/g (n=12 %100)	6.37±0.21 log kob/g (n=9 %75.0)	5.70±0.28 log kob/g (n=8 %66.7)	5.87±0.64 log kob/g (n=3 %25.0)	NA	NA
Bor (n=11)	5.99±0.77 log kob/g (n=11 %100)	6.58±0.84 log kob/g (n=10 %90.9)	6.11±0.54 log kob/g (n=5 %45.5)	5.98±0.77 log kob/g (n=3 %27.3)	6.02±0.45 log kob/g (n=2 %18.2)	NA	NA
Ulukışla (n=4)	6.11±0.25 log kob/g (n=4 %100)	6.94±0.16 log kob/g (n=3 %75.0)	6.14±0.40 log kob/g (n=4 %100)	5.56±0.17 log kob/g (n=4 %100)	5.44±1.68 log kob/g (n=2 %50.0)	NA	NA
Altunhisar* (n=1)	3.82 log kob/g (n=1 %100)	5.10 log kob/g (n=1 %100)	NA	NA	NA	NA	NA
Çiftlik* (n=1)	4.85 log kob/g (n=1 %100)	6.18 log kob/g (n=1 %100)	NA	NA	NA	NA	NA
Toplam (n=48)	5.77±0.91 (n=48 %100)	6.30±0.75 (n=46 %95.83)	6.33±0.46 (n=26 %54.17)	5.74±0.73 (n=23 %47.92)	5.56±0.76 (n=16 %33.33)	5.84±0.28 (n=3 %6.25)	5.53±0.41 (n=3 %6.25)

Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur. Ortalamalar ve standart sapmalar, yalnızca ilgili mikroorganizmanın tespit edilebilir düzeyde (>1 log kob/g) bulunduğu pozitif örnekler üzerinden hesaplanmıştır. TAMB değeri tüm örneklerde pozitif olduğu için tüm ilçeyi (n) temsil etmektedir. * Altunhisar ve Çiftlik ilçeleri için n=1 olduğundan standart sapma hesaplanamamıştır; bu ilçelere ait değerler yalnızca tek ölçümü yansıtmaktadır. TAMB: Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri; LAB: Laktik Asit Bakterileri; KoPS: Koagülaz Pozitif Stafilokok; FK: Fekal Koliform; NA: Tespit edilemedi.

Tablo 4: Anlamlı Spearman Korelasyon Analizi Sonuçları**Table 4:** Significant Spearman Correlation Analysis Results

Değişken Çifti	Spearman ρ	p Değeri	İlişki Yönü
pH –FK	0.319	0.027	Pozitif
Titre Edilebilir Asitlik – FK	-0.336	0.019	Negatif
Nem İçeriği – TAMB	0.292	0.044	Pozitif

Yalnızca istatistiksel olarak anlamlı korelasyon katsayıları ($p<0.05$) sunulmuştur. TAMB: Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri; FK: Fekal Koliform.

Tablo 5: Peynir Örneklerinin Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Karakterizasyonu ve Kümeleme Analizi Sonuçları**Table 5:** Physicochemical and Microbiological Characterization and Cluster Analysis Results of Cheese Samples

Parametre	Genel Ort±SS	SW* (p)	Levene ** (p)	Küme 1 (Yüksek pH/Yüksek nem) n=11	Küme 2 (Düşük nem/Yüksek Yağ) n=9	Küme 3 (Aktif fermentasyon) n=28	Anlamlılık (p)
Nem (%)	44.43 ± 8.43	0.380	0.360*	54.11 ^a	36.19 ^c	43.28 ^b	$p<0.001$ (Welch)
Sertlik (%)	59.06 ± 9.56	0.680	0.098	67.85 ^a	61.32 ^b	54.88 ^c	$p<0.001$ (ANOVA)
pH	5.10 ± 0.42	0.474	0.591	5.58 ^a	5.12 ^b	4.90 ^c	$p<0.001$ (ANOVA)
Asitlik (%LA)	1.82 ± 0.67	0.029	0.004*	0.91 ^c	1.75 ^b	2.20 ^a	$p<0.001$ (Welch)
TAMB (log kob/g)	5.77 ± 0.92	0.027	0.015*	5.96 ^a	4.45 ^c	6.12 ^a	$p<0.001$ (Welch)
LAB (log kob/g)	6.06 ± 1.38	0.000	0.000*	5.31 ^b	5.46 ^b	6.55 ^a	$p=0.008$ (Welch)
KoPS (log kob/g)	3.66 ± 2.95	0.000	0.000*	4.41 ^a	1.84 ^b	3.95 ^a	$p<0.001$ (Welch)
Yağ KM (%)	44.19 ± 13.81	0.020	0.679	45.16 ^b	63.92 ^a	37.47 ^c	$p<0.001$ (ANOVA)

* Shapiro-Wilk testi. $p<0.05$ ** Levene testi $p<0.05$: varyans homojenliği sağlanmamış. Veriler ortalama olarak verilmiştir. Aynı satırda farklı harflerle (a-b) ve (a-c) gösterilen küme ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). TAMB: Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri; LAB: Laktik Asit Bakterisi; KoPS: Koagülaz Pozitif Stafilokok; KM: Kuru Madde.

Kuru maddede tuz içeriğine göre yapılan değerlendirmede, analiz edilen 48 örneğin 37'sinin (%77.1) %3–5 aralığında, 11'inin (%22.9) ise %3'ün altında tuz içeriğine sahip olduğu belirlendi. Tuz içeriği %3'ün altında olan örneklerin merkez (n=3), Bor (n=3), Çamardı (n=2), Ulukışla (n=1), Altınhisar (n=1) ve Çiftlik (n=1) bölgelerinden temin edildiği tespit edildi. Ayrıca, tuz içeriğinin %4'ün üzerinde olduğu örneklerin merkez (n=7), Çamardı (n=2) ve Ulukışla (n=1) bölgelerinden elde edildiği belirlendi (Tablo 2).

Peynir örneklerinin kül içeriği %2 ile %7.2 arasında değişti. Çamardı bölgesinden alınan örnekler en yüksek ortalama kül içeriğine (%5.98±1.15) sahipken, Ulukışla'dan alınan örneklerin %75'inin kül içeriği %4'ün altında olup ortalama değeri %3.73±1.02 olarak tespit edildi (Tablo 2).

Analiz edilen peynir örneklerinin ortalama titre edilebilir asitliği (% laktik asit) %1.81±0.66 (min %0.44, maks %2.89) iken, ortalama pH değeri 5.09±0.42 (min 4.12, maks 6.28) olarak belirlendi (Tablo 2). Titre edilebilir asitlik ile pH arasında güçlü negatif bir ilişki belirlendi ($\rho=-0.783$, $p<0.001$).

Mikrobiyolojik analizler sonucunda KoPS örneklerin %54.17'sinde (n=26), mikrokok-stafilokoklar %47.92'sinde (n=23), maya ve küfler %33.33'ünde (n=16), koliform bakteriler %6.25'inde (n=3) ve FK %6.25'inde (n=3) belirlendi. Peynir örneklerinde belirlenen ortalama mikrobiyal yükler; TAMB için 5.77±0.91 log kob/g, LAB için 6.06±1.38 log kob/g, KoPS için 3.66±2.95 log kob/g, mikrokok-stafilokoklar için 3.01±2.68 log kob/g, maya ve küfler için 2.18±2.44 log kob/g, koliform bakteriler için 0.83±1.30 log kob/g, ve FK bakteriler için 0.81±1.23 log kob/g olarak tespit edildi.

Tüm örnekler (n=48) üzerinden hesaplanan LAB ve KoPS ortalamaları sırasıyla 6.06±1.38 ve 3.66±2.95 log kob/g olup bu değerler kümeleme analizinde kullanılmıştır. Sadece pozitif sonuç veren örnekler dikkate alındığında, ortalama mikrobiyal yüklerin LAB için 6.30±0.74 log kob/g, KoPS için 6.33±0.51 log kob/g, mikrokok-stafilokoklar için 5.74±0.71 log kob/g, maya ve küfler için 5.56±0.73 log kob/g, koliform bakteriler için 5.84±0.23 log kob/g ve FK bakteriler için 5.53±0.33 log kob/g olduğu hesaplandı.

Koliform ve FK bakterilerin yalnızca merkez ilçeye bağlı Kiledere, Elmalı, Yeşilburç ve Uluğaç lokasyonlarından alınan örneklerde tespit edildiği belirlendi. Ayrıca,

Çamardı'dan alınan örneklerde KoPS prevalansının %75, Ulukışla'dan alınan örneklerde ise %100 olduğu saptandı (Tablo 3). Spearman korelasyon analizi, peynir örneklerinin mikrobiyolojik profilinin başlıca pH, titre edilebilir asitlik ve nem içeriği tarafından şekillendirildiğini ortaya koydu, pH ile FK bakteriler arasında anlamlı pozitif bir korelasyon ($p=0.319$, $p=0.027$) titre edilebilir asitlik ile FK bakteriler arasında anlamlı negatif bir korelasyon ($p=-0.336$, $p=0.019$) ve nem içeriği ile TAMB sayısı arasında anlamlı pozitif bir ilişki ($p=0.292$, $p=0.044$) tespit edildi (Tablo 4).

Hiyerarşik kümeleme analizi, peynir örneklerini nem, pH, kuru maddede yağ oranı, titre edilebilir asitlik ve mikrobiyal yükler (TAMB ve LAB) temelinde istatistiksel olarak anlamlı üç farklı gruba ayırdı ($p<0.05$). Küme 1 ($n=11$), yüksek nem (54.11 ± 8.71) ve nispeten yüksek pH (5.58) değerleri ile; Küme 2 ($n=9$), yüksek kuru maddede yağ içeriği (63.92) ve düşük mikrobiyal yük ile; Küme 3 ($n=28$) ise düşük pH (4.90), yüksek asitlik (2.20 LA) ve yüksek TAMB: 6.12 log kob/g ve LAB: 6.55 log kob/g yükü ile karakterize edildi (Tablo 5). Mikrobiyolojik yüklerin ilçelere göre dağılımını gösteren tanımlayıcı istatistiklerde (Tablo 3) yalnızca pozitif sonuç veren örneklerin ortalamaları dikkate alındı. HKA ve ANOVA analizlerinde, veri setinin bütünlüğünü sağlamak amacıyla tespit sınırının altındaki değerler 0.5 log kob/g olarak kabul edilerek tüm veri seti ($n=48$) kullanıldı.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Peynir sınıflandırması sütün ısıtılmasına, hayvan türüne, olgunlaşma koşullarına, üretim tekniklerine, starter kültür kullanımına ve ortaya çıkan mikrobiyal ekosistem ile bileşim özelliklerine bağlı olarak çok sayıda teknolojik, mikrobiyolojik ve fizikokimyasal parametreye dayanmaktadır (Kamber ve Terzi 2008; Béjar-Lio ve ark. 2020). Bu çalışmada incelenen 48 tulum peyniri örneği. fizikokimyasal ve mikrobiyolojik profilleri bakımından birbirinden belirgin biçimde ayrılan üç kümeye ayrılmıştır. HKA sonuçlarına göre peynir örnekleri üç farklı kümeye ayrılmıştır (Tablo 5). Küme 1 ($n=11$), yüksek nem içeriği (54.11 ± 8.71), yüksek pH (5.58 ± 0.28) ve düşük titre edilebilir asitlik (0.91 ± 0.27 %LA) ile karakterize edilmiş olup, ağırlıklı olarak Merkez ilçe ve Ulukışla'dan temin edilen örnekleri içermektedir. Bu kümede LAB düzeyinin görece düşük (5.31 log kob/g) ve KoPS düzeyinin daha yüksek (4.41 log kob/g) olması, fermentasyon aktivitesinin sınırlı kalmış olabileceğini ve buna bağlı olarak mikrobiyal gelişim açısından daha elverişli koşulların oluşabileceğini düşündürmektedir (Luziatelli ve ark. 2024). Küme 2 ($n=9$), düşük nem içeriği (36.19 ± 4.56) ve yüksek kuru maddede yağ oranı (63.92 ± 9.45) ile diğer kümelerden ayrılmaktadır. Bu kümede yer alan örneklerin Merkez, Çamardı, Altunhisar ve Çiftlik bölgelerinden temin edildiği belirlenmiştir. Düşük su aktivitesi ile ilişkili olarak TAMB (4.45 ± 0.53 log kob/g) ve KoPS düzeylerinin (1.84 ± 2.63 log kob/g) daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum mikrobiyal gelişimin sınırlandırılmış olabileceğine işaret etmektedir. Örneklerin büyük çoğunluğunu oluşturan Küme 3 ($n=28$; %58.3), düşük pH (4.90 ± 0.34) ve yüksek titre edilebilir asitlik (2.20 ± 0.39 % LA) ile karakterize edilmiş olup, yüksek LAB düzeyi (6.55 ± 0.55 log kob/g) ile birlikte daha aktif bir fermentasyon profiline işaret etmektedir. Bu kümede Bor ilçesinden alınan örneklerin tamamının yer aldığı, ayrıca Çamardı ve Ulukışla'dan temin edilen örneklerin büyük bir bölümünün bu grupta yoğunlaştığı belirlenmiştir.

TGK'ya göre peynirler, yapısal sertliği yansıtan yağsız bazda nem (PYKN) esas alınarak ekstra sert (<49), sert ($49\leq PYKN<57$), yarı sert ($57\leq PYKN<64$), yarı yumuşak ($64\leq PYKN<70$) ve yumuşak (≥ 70) olarak sınıflandırılmaktadır (TGK 2015). Bu çalışmada incelenen örneklerin PYKN dağılımı ekstra sertten yumuşağa kadar tüm kategorileri kapsamış; örneklerin %12.5'i ($n=6$) ekstra sert, %27.1'i ($n=13$) sert, %33.3'ü ($n=16$) yarı sert, %12.5'i ($n=6$) yarı yumuşak ve %14.6'sı ($n=7$) yumuşak peynir olarak sınıflandırılmıştır. Ortalama PYKN değeri 59.06 ± 9.56 (yarı sert) olarak belirlenmiştir. Yumuşak peynir örneklerinin büyük bölümü Küme 1 profiliyle örtüşmektedir. Yüksek nem içeriği bu örneklerde yetersiz presleme gibi mekanik hataların yanı sıra pH ve su aktivitesindeki sapmaların enzim aktivitesini sınırlayarak sinerezisi engellemesinden kaynaklanmış olabilir (Béjar-Lio ve ark. 2020; Mazzocca ve ark. 2024).

Nem içeriği, peynirde yapısal bütünlüğü ve bileşimi etkileyen en kritik parametrelerden biridir. Türk Gıda Kodeksi'ne göre Tulum tipi peynirlerde maksimum nem içeriği %45'i geçmemelidir (TGK 2015). Niğde basma bideden tulum peynirleri geleneksel olarak çiğ süten üretilmekte ve plastik kaplarda kuru tuzlama yoluyla olgunlaştırılmaktadır. TGK'ya göre salamura yapılmadan olgunlaştırılan peynirler kategorisindedirler. Bu çalışmada örneklerin %54.2'si %45'in altında nem içeriğine sahipken, %45.8'i bu eşiği aşarak taze peynir özelliklerine yaklaşmıştır. Özellikle iki örnekte %65 ile %80 arasında değişen son derece yüksek nem seviyeleri gözlemlenmiş olup (Tablo 2) bu durum raf ömrünün ve mikrobiyolojik stabiliteyi önemli ölçüde tehlikeye atabilmektedir. Yüksek nem değerleri Küme 1 profiliyle doğrudan örtüşmekte; bu kümenin hem en yüksek su aktivitesine hem de en riskli mikrobiyolojik profile sahip olduğu anımsandığında, nem kontrolünün güvenlik açısından kritik bir kontrol noktası olduğu anlaşılmaktadır. Buna karşın Küme 2'deki düşük nem değerleri (36.19 ± 4.56), Tulum ve Zatar gibi olgunlaştırılmış çiğ süt peynirlerinde 150 güne kadar süren olgunlaşmanın ardından ulaşılan ~%33.3 nem düzeyiyle örtüşmektedir (Terzic-Vidojevic ve ark. 2007; Tarakçı ve Durmuş 2016; Cakir ve ark. 2016). Olgunlaştırılmış peynirlerin nihai nem içeriği, presleme süresi, olgunlaştırma süresi ve ambalaj malzemelerinden büyük ölçüde etkilenmektedir. Béjar-Lio ve ark. (2020), kısa presleme süreleriyle (1-4 saat) üretilen Chihuahua peynirlerinde nem düzeyinin %45.6-%51.1 arasında kaldığını, uzun süre preslenen peynirlerin ise %40-%43 arasında daha düşük nem sergilediğini ortaya koymuştur. Cakir ve ark. (2016), Erzincan Tulum peynirinde nem içeriğinin her 30 günlük olgunlaşma aralığında yaklaşık %1.1-1.2 azaldığını ve 30 ile 90 gün arasında toplam %2.32'lik bir nem kaybına yol açtığını bildirmiştir. Ambalaj malzemesi de nem düzenlemesinde belirleyici rol oynamaktadır. Hayaloğlu ve ark. (2007), plastik kaplarda olgunlaştırılan Tulum peynirlerinin geleneksel deri torbalarla kıyasla daha yüksek nem seviyelerini (%48.06-%48.77 ile %31.60-%37.17) koruduğunu gözlemlenmiştir. Bez torbalar ve toprak kaplar gibi gözenekli malzemelerin de plastik ambalajlara kıyasla nem buharlaşmasını teşvik ettiği ve kuruma sürecini hızlandırdığı bildirilmektedir (Tarakçı ve Durmuş 2016; Tekin ve Güler 2021).

Nem içeriği peynir matriksinde yağ dağılımı ve tuz konsantrasyonu üzerinde belirleyici bir rol oynamaktadır. Türk Gıda Kodeksi'ne göre peynirler kuru maddedeki yağ içeriğine bağlı olarak tam yağlı (>45), yarım yağlı (%25- <45), az yağlı (%10- <25) ve yağsız (<10) olarak sınıflandırılmaktadır (TGK 2015). Bu çalışmada örneklerin %37.5'inin ($n=18$) tam yağlı, %58.3'ünün ($n=28$) ise yarım

yağlı olduğu belirlenmiş olup, kuru maddede yağ içeriği ortalaması 44.19 ± 13.80 olarak saptanmıştır. Küme 2'de gözlenen yüksek kuru maddede yağ oranı (63.92 ± 9.45), bu gruba ait düşük nem içeriği ile ilişkili görünmektedir. Nem kaybını artıran olgunlaştırma koşullarının, yağın kuru madde içerisindeki göreceli konsantrasyonunu yükseltebileceği bilinmektedir. Nitekim gözenekli materyallerde gerçekleşen olgunlaşmanın nem kaybını kolaylaştırdığı, buna karşılık plastik kapların nemi koruyarak göreceli yağ oranında seyreltici bir etki oluşturabildiği bildirilmektedir (Tarakçı ve Durmuş 2016). Bu durum literatür bulgularıyla da uyumludur; Çakmakçı ve ark. (2008), plastik kaplarda olgunlaştırılan tulum peynirlerinde yağ oranını %29.25, deri torbalarda olgunlaştırılanlarda ise %33.0 olarak rapor etmiştir.

Tuz konsantrasyonu, peynir kalitesi, güvenliği ve olgunlaşma sürecini etkileyen bir diğer kritik faktördür. Türk Gıda Kodeksi, Tulum peyniri için kuru maddede maksimum %5 tuz limiti belirlemiştir (TGGK 2015). Bu çalışmada örneklerin %77.08'inde ($n=37$) tuz seviyeleri %3 ile %5 arasında bulunurken, %22.92'sinde ($n=11$) %3'ün altında kalmıştır. Plastik ambalaj, nem kaybını kısıtladığı için tuz konsantrasyonu artışını da sınırlandırmaktadır (Hayaloğlu ve ark. 2007; Çakmakçı ve ark. 2008) ve bu durum Küme 1'deki yüksek nem ve görece düşük tuz konsantrasyonu eğilimiyle tutarlıdır. Terzic-Vidojevic ve ark. (2007) geleneksel Zlatar peynirlerinde daha düşük tuz konsantrasyonları (%2.4-2.6) bildirilmektedirler. Bu çalışmada gözlemlenen nispeten daha yüksek tuz seviyeleri ise geleneksel işleme uygulamalarındaki farklılıkları yansıtmaktadır. Peynir örneklerinin kül içeriği %2.0 ile %7.2 arasında değişmiş olup ortalama 4.98 ± 1.22 olarak belirlenmiştir. En yüksek ortalama kül içeriği Çamardı örneklerinde (5.98 ± 1.15) tespit edilmiştir. Kül içeriği büyük ölçüde tuz konsantrasyonunu yansıtmakta olup bu iki parametre arasındaki paralellik, bölgesel tuzlama uygulamalarındaki farklılıklarla tutarlıdır. Nitekim Çamardı örneklerinde hem kül hem de kuru maddede tuz içeriğinin görece yüksek olması, bu bölgedeki geleneksel tuzlama pratiklerinin daha yoğun uygulandığına işaret edebilir.

Türk Gıda Kodeksi, peynirlerde titre edilebilir asitlik veya pH için doğrudan bir sınır değeri tanımlamamakla birlikte, bu parametreler mikrobiyal fermentasyon aktivitesinin temel göstergeleri arasında yer almaktadır. Bu çalışmada ortalama pH değeri 5.09 ± 0.42 ve titre edilebilir asitlik ortalaması 1.81 ± 0.66 LA olarak belirlenmiştir. Küme bazında değerlendirildiğinde, en düşük pH ve en yüksek asitlik değerlerinin Küme 3'te (4.90 ± 0.34 ; $2.20 \pm 0.39\%$ LA), en yüksek pH ve en düşük asitlik değerlerinin ise Küme 1'de (5.58 ± 0.28 ; $0.91 \pm 0.27\%$ LA) gözlenmesi, fermentasyon düzeyi ile asitlik gelişimi arasında belirgin bir ilişki bulunduğunu düşündürmektedir. Benzer şekilde olgunlaştırılmış peynirlerde 4-9 haftalık süreç sonunda pH değerlerinin genellikle 5.0-5.8 aralığında değiştiği bildirilmektedir (Béjar-Lio ve ark. 2020). Hayaloğlu ve ark. (2007), plastik kaplarda olgunlaştırılan Tulum peynirlerinde pH değerinin 90. günde 4.78-4.79 seviyesinden 150. günde 5.24'e yükseldiğini rapor etmiştir. Bu çalışmada bazı örneklerde pH değerinin 6.28'e kadar ulaşması, özellikle Küme 1'de gözlenen profil ile uyumlu olup, sınırlı asit üretimi veya ileri düzey proteoliz sonucunda oluşan alkali bileşiklerin varlığı ile ilişkili olabilir. Nitekim, Tarakçı ve Durmuş (2016) plastik ambalaj materyallerinin fermentasyon dinamiklerini ve asitlik gelişimini etkileyebileceğini bildirmiştir.

Fizikokimyasal parametrelerdeki bu değişkenlik, örneklerin mikrobiyolojik profilini doğrudan

şekillendirmektedir. TAMB, analiz edilen örneklerde ortalama 5.77 ± 0.91 log kob/g seviyesinde tespit edilmiştir; bu sonuç, başlangıç kültürleri kullanılmadan üretilen geleneksel çiğ süt peynirleriyle tutarlıdır. Küme 3'te TAMB yükünün en yüksek (6.12 log kob/g), Küme 2'de ise en düşük (4.45 ± 0.53 log kob/g) olduğu gözlemlenmiştir; Küme 1 ve Küme 3 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 5). Ayrıca nem içeriği ile TAMB sayısı arasında saptanan anlamlı korelasyon ($\rho=0.292$, $p=0.044$) bu ilişkiyi desteklemektedir (Cakir ve Cakmakci 2018; Fernandes Silva Rodrigues ve ark. 2021). Cakir ve Cakmakci (2018), Erzincan Şavak Tulum peynirinde TAMB 90 günün ardından 8.41 log kob/g'den 7.91 log kob/g'ye düştüğünü bildirmiştir. Bu çalışmadaki daha düşük sayımlar, kullanılan plastik kaplar ve olgunlaşma koşullarındaki farklılıklara bağlı olabilir.

Laktik asit bakterileri (LAB), örneklerin %95.83'ünde ortalama 6.06 ± 1.38 log kob/g seviyesinde diğer bakteri gruplarından daha yüksek düzeyde tespit edilmiştir. En yüksek LAB yükü, aktif fermentasyonun belirgin olduğu Küme 3'te (6.55 ± 0.55 log kob/g) gözlemlenirken, Küme 1'deki görece düşük LAB yükü (5.31 log kob/g) yetersiz fermentasyon hipotezini desteklemektedir. Cakir ve Cakmakci (2018), erken olgunlaşma aşamalarında 7.74 - 8.35 log kob/g arasında olan LAB sayısının sonraki aşamalarda ~ 7.15 log kob/g'a gerilediğini rapor etmiştir. Joković ve ark. (2011) ise LAB popülasyonlarının üretim aşamasında 6.5 log kob/g'den olgunlaşma sırasında 8.9 log kob/g'a yükseldiğini ve ardından 8.7 log kob/g civarında stabilize olduğunu gözlemlemiştir. Mevcut çalışmadaki LAB sayımları bu değerlerden biraz daha düşük olmakla birlikte geleneksel çiğ süt peynirlerinin beklenen mikrobiyotasıyla tutarlıdır. LAB, organik asitler, bakteriyosinler, hidrojen peroksit ve etanol gibi antimikrobiyal bileşikler üreterek peynir güvenliğine kritik katkılar sunmaktadır (Luziatelli ve ark. 2024). Bu çalışmada koliform bakterileri örneklerin %6.25'inde ($n=3$), FK ise %6.25'inde ($n=3$) saptanmış; bu pozitif örneklerin ikisinde her iki grup birlikte tespit edilmiştir. Tespit edilen koliform ve FK sayıları (sırasıyla ortalama 5.84 ± 0.23 ve 5.53 ± 0.33 log kob/g), LAB'nin inhibitör rolünü destekler niteliktedir; bazı araştırmalar da koliform seviyelerinin artan asitlik etkisiyle 60 ve 150 günün sonunda tespit edilemeyecek düzeye düştüğünü bildirmektedir (Cakir ve Cakmakci 2018; Sánchez-Gamboa ve ark. 2018).

Koliform gelişimi üzerinde LAB aktivitesi ve asitlik artışının yanı sıra su aktivitesi ile tuz oranı da belirleyici rol oynamaktadır (Luziatelli ve ark. 2024). Asitlik gelişiminin logaritmik büyüme evresinden önce gerçekleşmesi bakterileri baskılamada daha etkiliyken, yavaş asit artışı "erken şişme" gibi yapısal bozukluklara yol açabilmektedir. Pastörizasyon sonrası ekipman, hava veya su kaynaklı sekonder kontaminasyonlar ile proteoliz sonucu pH'nı yeniden yükselmesi, baskılanmış koliformların tekrar çoğalmasına zemin hazırlayabilmekte; bu nedenle hızlı asit gelişimi ve düşük pH, FK eliminasyonunda en kritik kontrol parametreleri olarak öne çıkmaktadır (Girma ve Aemiro 2021). Çalışmamızda koliform ve FK tespit edilen toplam 4 örneğin tamamı merkez ilçelerden temin edilmiş olup bu örnekler Küme 1 ile örtüşen yüksek pH ve düşük asitlik profili sergilemiştir. Örneklerin nem, tuz ve pH değerleri sırasıyla %37.5-66.8. %2.9-4.5 ve 5.0-6.28 aralığında değişmiştir. Bu örneklerde koliform varlığında; kontamine su ve yetersiz personel hijyeni, yetersiz doğal starter aktivitesine bağlı geç asit gelişimi ve yüksek su aktivitesi gibi faktörlerin birleşik etkisinin rol oynadığı düşünülmektedir (Caldeira ve ark.

2024). Bu çalışmada da pH ile FK arasında anlamlı pozitif korelasyon ($p=0.319$, $p=0.027$) ve titre edilebilir asitlik ile FK arasında anlamlı negatif korelasyon ($p=-0.336$, $p=0.019$) saptanmıştır (Tablo 4).

Bu çalışmada örneklerin %54.2'sinde ($n=26$) KoPS seviyeleri ortalama 6.33 ± 0.51 log kob/g düzeyinde tespit edilmiş olup çığ süt peynirleri için 4-5 log kob/g kabul edilebilir limit belirleyen TKG düzenleyici sınırları aşılmıştır. KoPS yükünün Küme 1'de en yüksek (4.41 ± 2.44 log kob/g), Küme 2'de ise en düşük düzeyde olması (1.84 ± 2.63 log kob/g), nem ve pH kontrolünün hijyen riski üzerindeki belirleyici etkisini bir kez daha ortaya koymaktadır. Küme 3'te KoPS düzeyinin (3.95 log kob/g) Küme 1 ile istatistiksel olarak benzer bulunması ($p>0.05$), aktif fermentasyon profiline rağmen bu kümedeki bazı örneklerin olgunlaşma öncesi yüksek başlangıç mikrobiyal yüküne veya post-proses kontaminasyona maruz kalmış olabileceğine işaret etmektedir (Samelis ve ark. 2025). Benzer yüksek KoPS seviyeleri Chihuahua peynirlerinde de bildirilmiş; artan asitlik ve mikrobiyal rekabet nedeniyle olgunlaşma sırasında 6.9 log kob/g'ye ulaşan değerlerin kademeli olarak azaldığı görülmüştür (Sánchez-Gamboa ve ark. 2018; TKG 2025). Fernandes Silva Rodrigues ve ark. (2021), yüksek su aktivitesi ve nötre yakın pH'a sahip geleneksel peynirlerde yetersiz hijyen koşulları ve pastörizasyon sonrası kontaminasyonlar nedeniyle *S. aureus* gibi KoPS'ların 7.0 log kob/g gibi kritik seviyelere ulaşabildiğini göstermiştir. LAB'ın peynirin genelinde baskın flora olmasına rağmen KoPS'un yüksek seviyelerde varlığını sürdürmesi, birkaç etkenin bir arada rol oynamasıyla açıklanabilir. Öncelikle, termizasyonun sub-pastörizasyon düzeyinde bir ısı işlem olması nedeniyle KoPS'u tamamen elemine etmediği, özellikle çığ sütteki başlangıç kontaminasyon düzeyinin zaten yüksek olduğu durumlarda son üründe önemli düzeyde stafilokokun sağ kalabildiği bildirilmiştir (Samelis ve ark. 2025). Bunun yanı sıra, ısı işlem kontrolünün zayıf olmasının, ekipman yüzeyleri ve işleyici eli kaynaklı post-proses bulaşmanın, ısı işlem sonrası düşük düzeyde kalan veya yeniden bulaşan KoPS'un üretim aşamaları boyunca artmasına katkıda bulunabildiği gösterilmiştir (Rola ve ark. 2016; Grecellé ve ark. 2020). Bu çalışmada Küme 1'de gözlenen yüksek nem ve pH koşullarıyla birlikte artan KoPS düzeyleri de bu bulgularla tutarlıdır; pH ve su aktivitesinin stafilokok büyümesini doğrudan etkilediği bilinmektedir (Golić ve ark. 2022).

Mikrokok-stafilokok grubu bakteriler örneklerin %47.92'sinde ($n=23$) ortalama 5.74 ± 0.71 log kob/g yük ile tespit edilmiştir. Bu grubun varlığı, çevresel kontaminasyonun yanı sıra proteolitik ve lipolitik aktiviteler yoluyla lezzet gelişimine potansiyel katkıları bakımından değerlidir. Küme bazında değerlendirildiğinde, mikrokok-stafilokok prevalansının Küme 1'de görece düşük asitlik ve yüksek nem koşullarıyla birlikte daha yüksek seyrettiği, Küme 2'de ise düşük su aktivitesine bağlı olarak sınırlı kaldığı gözlemlenmiştir. Maya ve küfler ise örneklerin %33.33'ünde ($n=16$) 5.56 ± 0.73 log kob/g ile saptanmış olup bu sonuç, maya ve küf sayılarının 5.48 - 5.75 log kob/g arasında değiştiği geleneksel Tulum peynirlerindeki bulgularla tutarlıdır (Cakir ve Cakmakci 2018). Deri gibi gözenekli malzemelerin artan oksijen geçirgenliği yoluyla maya ve küf gelişimini teşvik ettiği, plastik malzemelerde bu gelişimin sınırlı olduğu rapor edilmektedir (Çakmakçı ve ark. 2008; Tekin ve Güler 2021). Maya ve küf yükünün Küme 2'de diğer kümelerle kıyasla daha düşük düzeyde kalması, bu kümedeki düşük su aktivitesinin maya ve küf gelişimini de kısıtladığını düşündürmektedir.

Bu çalışma, geleneksel Niğde basma bidon tulum peynirinin fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerini değerlendirmektedir. Hiyerarşik kümeleme analizi, örnekleri geleneksel üretim, doğal mikroflora ve işleme koşullarındaki yüksek değişkenliği yansıtan üç farklı profile ayırmıştır. Yüksek KoPS prevalansı ve nem seviyeleri, çığ süt kullanımında ve kontrolsüz fermentasyonda bazı güvenlik açıkları olduğunu göstermektedir. Yönetmelikler patojen azaltımı için 120 günlük bir olgunlaşma süresi gerektirse (TKG, 2015) de, saha uygulamaları genellikle yetersiz çevresel kontroller veya erken pazarlama nedeniyle sapma göstermektedir. Niğde basma bidon tulum peynirlerinin geleneksel mirasını korurken gıda güvenliğini artırmak için, uygulanabilir bazı müdahaleler gerçekleştirilebilir. Yerel yetkililer ve ilgili paydaşlar, özellikle süt hijyeni, kontrollü pastörizasyon seçenekleri ve değişkenliği en aza indirmek için birincil veya başlangıç kültürlerinin kullanımı konularına odaklanan İyi Üretim Uygulamaları (GMP) konusunda üreticiler için uygulamalı atölyeler düzenleyebilirler. Ek olarak, yerel süt toplama merkezlerinde soğuk zincirin yaygınlaştırılması, ilk kontaminasyonu azaltmaya yardımcı olabilirken, erişilebilir mikrobiyal tarama programları, işleme öncesinde çığ süt kalitesinin izlenmesine yardımcı olabilir. Hijyen uygulamalarının ve olgunlaşma sürelerinin standartlaştırılması, halk sağlığı sonuçlarının iyileştirilmesine, yerel ekonominin desteklenmesine ve potansiyel olarak gelecekte Coğrafi İşaret sertifikasyonu başvurularının kolaylaştırılmasına katkıda bulunabilir.

Altınhisar ve Çiftlik bölgelerinden yalnızca tek bir peynir örneğinin alınmış olması nedeniyle, söz konusu peynir örneklerinden elde edilen verilerin, bu bölgelerin tamamını yansıtacak şekilde genelleştirilemeyecek olması, bu çalışmanın sonuçlarının yorumlanmasında temel bir sınırlamadır. Ayrıca, olgunlaşma süreleri, bağımsız bir doğrulama olmaksızın yalnızca üreticinin kendi beyanlarına dayanmaktadır. Gelecekteki çalışmalar, peynir güvenliği ve kalitesini optimize etmek için daha geniş bir coğrafi örnekleme çerçevesi, genel fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özellikler ile olgunlaşma zaman çizelgesinin takibini dikkate almalıdır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

YAZAR KATKILARI

Fikir/Kavram: FK, CB
Denetleme/Danışmanlık: NEO
Veri Toplama ve/veya İşleme: FK, TŞŞ, CB
Analiz ve/veya Yorum: FK, TŞŞ
Makalenin Yazımı: FK, TŞŞ
Eleştirel İnceleme: NEO

KAYNAKLAR

- Alfaki HI, Ogbonna IO, Maibasha D et al (2026). Molecular insights into the cheese microbiome: Mapping microbial diversity and functional pathways shaping flavor and quality. *J Health Well Saf Res*, 11(3), 1-25.
- Béjar-Lio GI, Gutiérrez-Méndez N, Nevárez-Moorillón GV (2020). Microbiological and physicochemical characteristics of Chihuahua cheese manufactured with raw milk. *AIMS Agric Food*, 5(1), 1-15.
- Cakir Y, Cakmakci S, Hayaloglu AA (2016). The effect of addition of black cumin (*Nigella sativa* L.) and ripening period on proteolysis, sensory properties and volatile profiles of Erzincan Tulum (Şavak) cheese made from raw Akkaraman sheep's milk. *Small Rumin Res*, 134, 65-73.

- Cakir Y Cakmakci S (2018).** Some microbiological, physicochemical and ripening properties of Erzincan Tulum cheese produced with added black cumin (*Nigella sativa* L.). *J Food Sci Technol*, 55(4), 1435-1443.
- Cakmakci S, Dagdemir E, Hayaloglu AA et al (2008).** Influence of ripening container on the lactic acid bacteria population in Tulum cheese. *World J Microbiol Biotechnol*, 24(3), 293-299.
- Caldeira LA, Valente GL, Barbosa CD et al (2024).** Profile of lactic acid bacteria (MALDI-TOF-MS) and physico-chemical and microbiological characteristics of the raw milk and fresh artisanal cheese from Serra Geral, Minas Gerais. *Brazil Food Res Int*, 176, 113831.
- Çetin B, Temir Ö, Köşeci AT (2025).** Evaluation of local cheeses within the scope of sustainable gastronomy tourism: A case from Niğde. *J Tour Gastron Stud*, 13(3), 3240-3252.
- Fernandes Silva Rodrigues L, Lunara Santos Pavelquesi S, Almeida de Oliveira Ferreira AC et al (2021).** Microbiological evaluation of industrialized and artisanal Minas fresh cheese commercialized in the Federal District, Brazil. *Food Sci Technol*, 42, e45221.
- Girma A, Aemiro A (2021).** Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from fermented Ethiopian traditional dairy products against food spoilage and pathogenic bacterial strains. *J Food Qual*, 2021(1), 9978561.
- Golić B, Nedić D, Šmitran A (2022).** Detection and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* isolates in artisanal cheese made from raw milk. *Acta Alimentaria*, 51(2), 185-193.
- Grecelle CBZ, Mascitti AK, da Silva L, Lunge VR, da Costa M (2020).** Characterization of *Staphylococcus* species isolated in production stages of Brazilian Colonial cheese. *J Trop Pathol*, 49(1), 1-10.
- Guinee TP, Pudja PD, Farkye NY (2007).** Fresh acid-curd cheese varieties. In: *Cheese: Chemistry, physics and microbiology* (Vol 2), Academic Press, London.
- Halkman AK (2005).** Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları, Başak Matbaacılık Ltd. Şti. Ankara.
- Hayaloglu AA, Cakmakci S, Brechany EY et al (2007).** Microbiology, biochemistry and volatile composition of Tulum cheese ripened in goat's skin or plastic bags. *J Dairy Sci*, 90, 1102-1121.
- ISO (1998).** Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria -- Colony-count technique at 30 °C, ISO 15214:1998. Erişim Tarihi: 25 Nisan 2025. Erişim Adresi: <https://www.iso.org/standard/26345.html>
- ISO (2013).** Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique, ISO 4833-1:2013, Erişim Tarihi: 31 Mart 2025, Erişim Adresi: <https://www.iso.org/standard/53728.html>
- ISO (2021).** Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) — Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium, ISO 6888-1:2021, Erişim Tarihi: 25 Nisan 2025, Erişim Adresi: <https://www.iso.org/standard/75145.html>
- Joković N, Vukasinović M, Veljović K et al (2011).** Characterization of non-starter lactic acid bacteria in traditionally produced home-made Radan cheese during ripening. *Arch Biol Sci*, 63(1), 1-10.
- Kamber U, Terzi G (2008).** The traditional cheeses of Turkey: Middle and Eastern Blacksea Region. *Food Rev Int*, 24(1), 95-118.
- Luziatelli F, Abou Jaoudé R, Melini F et al (2024).** Microbial evolution in artisanal pecorino-like cheeses produced from two farms managing two different breeds of sheep (Comisana and Lacaune). *Foods*, 13(11), 1728.
- Mazzocca R, Di Paolo M, Peruzzi MF et al (2024).** Physicochemical and microbiological characterisation of a typical Italian raw ewe's milk cheese: Pecorino bagnolese. *Int Dairy J*, 157, 105998.
- Rola JG, Czubkowska A, Korpysa-Dzirba W, Osek J (2016).** Occurrence of *Staphylococcus aureus* on farms with small scale production of raw milk cheeses in Poland. *Toxins*, 8(3), 62.
- Samelis J, Bosnea L, Kakouri A (2025).** Microbiological quality and safety of raw sheep milks from native Epirus breeds: Selective effects of thermization on the microbiota surviving in resultant thermized milks intended for traditional Greek hard cheese production. *Applied Microbiology*, 5(1), 11.
- Sánchez-Gamboa C, Hicks-Pérez L, Gutiérrez-Méndez N et al (2018).** Microbiological changes during ripening of Chihuahua cheese manufactured with raw milk and its seasonal variations. *Foods*, 7(9), 153.
- Sayın B, Kızılkaya P, Özhamamcı İ et al (2025).** Comparative evaluation of traditional and industrial kashar cheeses based on physicochemical, textural, color, and sensory attributes. *Gıda*, 50(6), 1220-1229.
- Tarakçı Z, Durmuş Y (2016).** Effects of packaging materials on some ripening characteristics of Tulum cheese. *Mljekarstvo*, 66(4), 293-303.
- Tekin A, Guler Z (2021).** The effect of ripening medium (goat skin bag or plastic barrel) on the volatile profile, color parameter and sensory characteristics of Tulum cheese. *J Cent Eur Agric*, 22(1), 19-38.
- Terzic-Vidojevic A, Vukasinovic M, Veljovic K et al (2007).** Characterization of microflora in homemade semi-hard white Zlata cheese. *Int J Food Microbiol*, 114(1), 36-42.
- TGK (Türk Gıda Kodeksi) (2015).** Türk Gıda Kodeksi Peynir Tebliği (Tebliğ No: 2015/6), Erişim Tarihi: 28 Ocak 2025, Erişim Adresi: <https://www.resmi.gazete.gov.tr/eskiler/2015/02/20150208-5.htm>.
- TGK (Türk Gıda Kodeksi) (2025).** Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği, Erişim Tarihi: 25 Ocak 2025, Erişim Adresi: <https://www.mevzuat.gov.tr/mevzuat?MevzuatNo=41291&MevzuatTur=7&MevzuatTertip=5>
- TSE (1990).** Peynir - Yağ muhtevası tayini - Gerber metodu, TS 8189, Erişim Tarihi: 25 Ocak 2025, Erişim Adresi: <https://intweb.tse.org.tr>.
- TSE (2006).** Peynir - Beyaz peynir, TS 591, Erişim Tarihi: 10 Nisan 2025, Erişim Adresi: <https://intweb.tse.org.tr>.



Determination of Fumonisin Levels in Flour and Tarhana Samples from Different Provinces of Türkiye

Ömer ÇAKMAK^{1,*}, Ulaş ACARÖZ^{2,4}, Damla ARSLAN ACARÖZ³, Zeki GÜRLER², Ali SOYLU², Fahriye KAN³, Recep KARA², Thomai LAZOU⁵

¹ Istanbul Esenyurt University, Faculty of Arts and Social Sciences, Department of Gastronomy and Culinary Arts, 34510, İstanbul, Türkiye

² Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, 03200, Afyonkarahisar, Türkiye

³ Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, 03200, Afyonkarahisar, Türkiye

⁴ Kyrgyz-Turkish Manas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, KG-720038, Bishkek, Kyrgyzstan

⁵ Aristotle University of Thessaloniki, School of Veterinary Medicine, Laboratory of Animal Food Products Hygiene-Veterinary Public Health, GR54124, Thessaloniki, Greece

Received: 02.04.2026

Accepted: 4.06.2026

ABSTRACT

Fumonisinler are toxic secondary metabolites synthesized by fungi belonging to the genus *Fusarium*. These compounds are frequently detected in cereal-derived food products and are considered important contaminants because they can compromise food hygiene and quality, thereby posing a potential concern for public health. This study aimed to determine fumonisin levels in samples of various cereal flours and tarhana, a traditional fermented cereal-based product widely consumed in Türkiye, typically prepared from wheat flour, yogurt, vegetables, and spices. Samples were collected from three provinces in Türkiye-Afyonkarahisar, Denizli, and Uşak-and analyzed using the ELISA method. A total of 80 samples were analyzed, including wheat (n=31), corn (n=12), barley (n=9), rye (n=6), chickpea (n=2) flours, and tarhana (n=20). Fumonisin contamination was detected in 12.5% of the samples (n=10), with concentrations ranging from 15.6 to 39.6 mg/kg, exceeding the maximum limits set by the Turkish Food Codex. The highest incidence was observed in corn flour (58.3%), followed by rye (33.3%) and barley (11.1%) flours. The remaining 87.5% of samples were below the detection limit. These results emphasize the need for continuous monitoring and strict control to ensure the safety and quality of cereal products in Türkiye. In addition, no fumonisin contamination was detected in any of the tarhana samples analyzed, suggesting that tarhana may be relatively safe with respect to fumonisin risk.

Keywords: Cereal flour, ELISA, Fumonisin, Public health, Tarhana.

ÖZ

Türkiye'nin Farklı İllerinden Alman Un ve Tarhana Örneklerinde Fumonisin Düzeylerinin Belirlenmesi

Fumonisinler, *Fusarium* cinsine ait mantarlar tarafından sentezlenen toksik ikincil metabolitlerdir. Bu bileşikler sıklıkla tahıl bazlı gıda ürünlerinde tespit edilir ve gıda hijyenini ve kalitesini bozarak halk sağlığı için potansiyel bir endişe kaynağı oluşturabildikleri için önemli kirleticiler olarak kabul edilirler. Bu çalışma, çeşitli tahıl unları ve Türkiye'de yaygın olarak tüketilen, tipik olarak buğday unu, yoğurt, sebze ve baharatlardan hazırlanan geleneksel fermente tahıl bazlı bir ürün olan tarhana örneklerinde fumonisin düzeylerini belirlemeyi amaçlamıştır. Örnekler, Türkiye'nin üç ilinden (Afyonkarahisar, Denizli ve Uşak) toplanmış ve ELISA yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Buğday (n=31), mısır (n=12), arpa (n=9), çavdar (n=6), nohut (n=2) unları ve tarhana (n=20) olmak üzere toplam 80 örnek analiz edilmiştir. Örneklerin %12.5'inde (n=10) fumonisin kontaminasyonu tespit edilmiş olup, konsantrasyonlar 15.6 ile 39.6 mg/kg arasında değişmekte ve Türk Gıda Kodeksi tarafından belirlenen maksimum limitleri aşmaktadır. En yüksek görülme sıklığı mısır ununda (%58.3), ardından çavdar (%33.3) ve arpa (%11.1) unlarında gözlemlenmiştir. Geri kalan %87.5'lik numuneler tespit limitinin altında kalmıştır. Bu sonuçlar, Türkiye'deki tahıl ürünlerinin güvenliği ve kalitesinin sağlanması için sürekli izleme ve sıkı kontrolün gerekliliğini vurgulamaktadır. Ayrıca, analiz edilen tarhana örneklerinin hiçbirinde fumonisin kontaminasyonu tespit edilmemiştir; bu da tarhananın fumonisin riski açısından nispeten güvenli olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: ELISA, Fumonisin, Halk sağlığı, Tahıl unu, Tarhana.



INTRODUCTION

Cereals and cereal-based products are among the most traditional and important sources of energy and nutrients worldwide (Yazar and Kokini 2025). Their high nutritional value is primarily attributed to their rich content of dietary fibers (e.g., beta-glucan, arabinoxylan, and resistant starch), proteins, minerals, vitamins, and phytoestrogens with antioxidant properties. Evidence suggests that these functional components may reduce the risk of non-communicable diseases such as cancer, cardiovascular disorders, and obesity. Consequently, cereals have gained widespread use in bakery, dietetic, infant, and breakfast-related products (Khatoun and Maity 2025).

Despite their nutritional benefits, cereals are susceptible to contamination by chemical food safety hazards, particularly mycotoxins. Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by fungal genera such as *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, and *Claviceps* (Tsouloufi 2024). Of these, the *Fusarium* species are of great concern due to their ability to grow rapidly on grains in favorable temperature and moisture conditions, causing food spoilage and toxic accumulation. *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* are recognized as major fumonisin-producing species, alongside others such as *F. napiforme*, *F. anthophilum*, *F. dlamini*, and *F. nygamai* (Navale et al. 2022; Reinhold et al. 2024).

Fumonisin is classified into four groups (A, B, C, and P), with group B fumonisins being the most relevant in terms of toxicology and frequency of occurrence. The main representatives of this group are Fumonisin B1 (FB₁), B2 (FB₂), B3 (FB₃), and B4 (FB₄), with FB₁ being the most prevalent. Although fumonisins are not considered genotoxic, mutagenic, or teratogenic (EFSA 2018; Andrade 2023), they exert neurotoxic and immunotoxic effects through disruption of lipid metabolism, particularly by strongly inhibiting sphingolipid biosynthesis. This mechanism can result in necrotic brain lesions (Khan et al. 2024; Szabo et al. 2025). Epidemiological studies further indicate a higher incidence of esophageal cancer in regions where fumonisin-contaminated maize is widely consumed (Schieszl et al. 2025).

Fumonisin has been detected in a wide range of foodstuffs, including maize and maize-derived products (Ma and Guo 2025), rice, millet, beans, sorghum, wheat noodles, pickled red pepper, black-eyed peas, asparagus, soybeans, garlic, onion, black radish, black tea, sage, linden and chamomile flowers, mint, nettle, figs and peanuts (Karbancıoğlu-Güler and Heperkan 2009; Kanabus et al. 2025), and even milk and eggs from animals fed contaminated feed. Their distribution within maize kernels is heterogeneous, with higher concentrations in the outer layers, resulting in lower levels in processed products such as corn flour and semolina (Castells et al. 2008).

Although FB₁ is heat-stable, like other mycotoxins, partial degradation can occur at elevated temperatures. For instance, in a study by Humpf and Voss (2004), heating contaminated maize products at 190 °C for 60 minutes reduced fumonisin content by 60.0-80.0%, while treatment at 220 °C for 25 minutes completely eliminated fumonisins. Due to their toxicological significance, many countries have established maximum permissible levels for fumonisins. In the European Union, the combined maximum levels of FB₁ and FB₂ are set at 4000 µg/kg in unprocessed maize and range between 200 and 1000 µg/kg in maize-based foodstuffs (European Commission 2023). In Türkiye, the Turkish Food Codex Contaminants Regulation specifies limits of 4000 µg/kg in unprocessed

maize, 1000 µg/kg in maize and maize-based foods intended for direct consumption, 800 µg/kg in maize-based breakfast cereals and snacks, 2000 µg/kg in maize flours not intended for consumers, 1400 µg/kg in other milled maize products, and 200 µg/kg in baby foods (Tarım ve Orman Bakanlığı 2023).

In Türkiye, wheat, maize, rye, and chickpea flours are widely produced and consumed. Moreover, tarhana-a traditional fermented cereal-based product prepared from wheat flour, semolina, or mixtures thereof with yogurt, vegetables, and herbs-represents a culturally significant staple food consumed across all age groups. Despite its popularity, little is known about the potential risk of fumonisin contamination in tarhana, particularly given its complex production process and widespread consumption. Considering both the public health implications and the lack of existing data, this study aimed to investigate the presence and levels of fumonisins in various flour types and tarhana samples collected from three provinces in Türkiye (Afyonkarahisar, Denizli, and Uşak). By addressing this gap, the study provides valuable insights into food safety risks associated with traditional cereal-based products and contributes to the development of more effective monitoring and regulatory strategies.

MATERIAL AND METHODS

Sample Collection

A total of 80 food samples were collected from three provinces of Türkiye (Afyonkarahisar, Denizli, and Uşak) between October and December 2023. Of these, 60 were flour samples (31 wheat flour, 12 corn flour, 9 barley flour, 6 rye flour, and 2 chickpea flour) and 20 were tarhana samples obtained from Denizli. All samples were purchased from different commercial producers in local open markets.

Sample Preparation

All flour and tarhana samples were finely homogenized prior to analysis. Fifty grams of each flour sample were finely ground, and 5 g subsamples were weighed into separate containers. To each subsample, 25 mL of extraction solution (70.0% methanol, 4.0% NaCl, and distilled water) was added. The mixture was homogenized for 3 minutes and subsequently filtered through Whatman No. 1 filter paper. From the filtrate, 50 µL was transferred into a new tube and diluted with 950 µL of distilled water (1:20 dilution). After mixing, 50 µL of the diluted extract was used for analysis.

ELISA Assay

Fumonisin extraction and quantification were performed using the Celer FUMONISINO commercial ELISA kit (Tecna, Eurofins Technologies, Italy; Code No: MF100/101), following the manufacturer's instructions. This kit is designed for the detection of FB₁, FB₂, and FB₃ in cereals and cereal-based products. The microtiter plate is pre-coated with anti-fumonisin antibodies. During the assay, fumonisins in the samples and standards compete with the immobilized antigen for antibody binding sites. Subsequently, enzyme conjugate and substrate reagents are added to facilitate color development. The optical density (OD) values of the samples are inversely proportional to fumonisin concentration. Quantification was achieved by comparing sample OD values with those of the calibration curve generated using fumonisin B1 standards. The calibration curve employed in the quantitative assessment is presented in Figure 1.

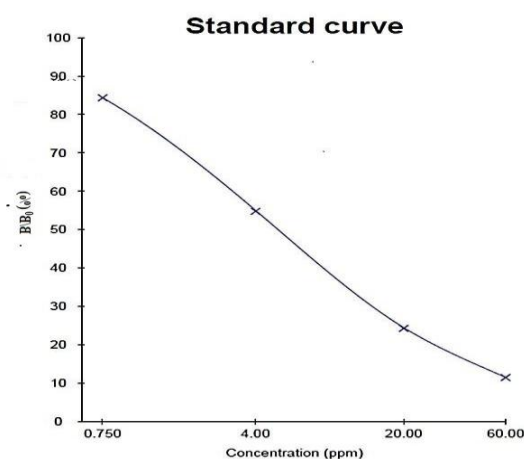


Figure 1: Standard calibration curve for fumonisin concentration measurement.

B/B₀: Standard (or sample) absorbance/Standard 0 ppm (B₀) absorbance X 100

During the assay setup, one well was assigned for each standard and sample. Into each premixing well, 100 µL of enzyme conjugate and 50 µL of either standard solution (0, 0.75, 4, 20, and 60 ppm) or sample extract were added. Using a micropipette, 100 µL aliquots were transferred three times from each premixing well into the corresponding anti-fumonisin antibody-coated microwells. The plate was incubated at room temperature for 10 minutes. Following incubation, the liquid was discarded, and all wells were washed three times with washing buffer. The plate was inverted, and residual droplets were removed by tapping firmly on absorbent paper. Subsequently, 100 µL of development solution was added to each well, mixed briefly by rotation, and incubated at room temperature for 10 minutes. The reaction process was stopped by adding 50 µL of stop solution to each well. Then, absorbance values were determined at 450 nm using a microplate reader within 60 minutes.

The percentage absorbance of each sample was calculated using the formula:

% Absorbance = Absorbance of sample or standard / Absorbance of 0 ppm standard (B₀) × 100

The values obtained were multiplied by the dilution factor (20). The detection limit of the kit was 0.75 mg/kg.

Statistical Analysis

All data obtained from the experiments were processed using Microsoft Excel 2019. Results are expressed as mean values ± standard deviation (SD). For categorical data, the Chi-Square Test of Independence was applied to evaluate potential associations between sample type and fumonisin occurrence. In cases where expected cell counts were below 5, Fisher's Exact Test was additionally performed to confirm the robustness of the results. Statistical significance was considered at $p < 0.05$.

RESULTS

The fumonisin concentrations in different flour types and tarhana samples are presented in Table 1. Overall, fumonisins were detected in 13.0% of the flour samples. Contamination was most frequent in corn flour (58.0%), followed by rye flour (33.0%) and barley flour (11.0%). The mean concentrations of fumonisins in positive corn,

barley, and rye samples were 28.5, 16.4, and 18.9 mg/kg, respectively. As shown in Table 1, fumonisin contamination was observed in corn, barley, and rye flours, but not in wheat, chickpea, or tarhana samples. A Chi-Square Test of Independence (2×6) confirmed a significant association between flour type and fumonisin positivity ($\chi^2=33.016$, $df=5$, $p<0.001$, Cramér's $V=0.642$). Because some expected cell counts were below 5, a Fisher's Exact Test (corn vs. other flours) was conducted, which confirmed corn flour as a high-risk category ($OR \approx 30.33$, $p < 0.001$).

Table 2 presents the range of fumonisin concentrations and contamination percentages across flour types and tarhana samples. In total, 10 samples exceeding the maximum acceptable limit of the Turkish Food Codex (12.5%) were detected. The distribution of fumonisin-positive flour samples per province is presented in Table 3. As regards corn flour, the highest percentage of positive samples was detected in Denizli province (100%) and the lowest in Uşak (25.0%). As regards barley and rye flours, the highest percentage of positive samples was observed in Denizli (33.3% and 50.0%, respectively).

DISCUSSION AND CONCLUSION

The presence of fumonisins in cereals and cereal products is an important food safety hazard worldwide. Previous studies conducted in Türkiye and other countries have detected fumonisins in cereals and cereal products (Table 4), including different flour types (wheat, corn, barley, rye, and soy, etc.). In this study conducted with different flour types and tarhana samples, 10 out of 80 samples (12.5%), 7 of which were corn flour (58.3%), 2 of which were rye flour (33.3%), and 1 of which were barley flour (11.1%), were contaminated with fumonisin in the range of 16.7-39.6 mg/kg, 15.6-22.1 mg/kg, and 16.04 mg/kg respectively, even though 31 wheat flour (0%), 2 chickpea flour (0%) and 20 (0%) tarhana samples were all found to be fumonisin negative. Ocak and Bostan (2010) reported that 56.0% of corn flour samples obtained from Istanbul were contaminated with fumonisin in the range of 257-5580 µg/kg. They also stated that 25.0% of these samples were above the legal limit. In a study conducted with different flour types, 18 out of 135 samples (13.3%), 16 of which were corn flour (100%) and 2 of which were rye flour (11.1%), were contaminated with fumonisin in the range of 0-103 µg/kg and 670-1684 µg/kg, respectively, while 82 wheat flour (0%) and 19 barley flour (0%) samples were all found to be fumonisin negative (Kaya and Tosun 2013). In İzmir, fumonisin was detected in 45 (78.9%) of 57 corn and corn-based samples (Bakırcı 2014). Our findings aligned with these reports show contamination primarily in corn and rye flour, while wheat flour samples remained fumonisin-free.

A review of the literature revealed no studies investigating fumonisin contamination in tarhana samples, either in Türkiye or internationally. In the present study, 20 tarhana samples were analyzed, and all were found to be negative for fumonisin contamination.

In contrast, no fumonisin contamination was detected in the wheat flour, chickpea flour, or tarhana samples analyzed in this study. While these findings suggest a lower risk associated with these products, caution should be exercised in their interpretation. In particular, the very

Table 1: Fumonisin levels in different flour types and Tarhana samples.

Samples (n)	Number of samples n (%)		Concentration (mg/kg)		Positive samples
	Positive	Negative	Minimum	Maximum	Mean±SD
Wheat flour (31)	0 (0)	31 (100)	-	-	-
Corn flour (12)	7 (58.3)	5 (41.7)	16.7	39.6	28.5±8.15
Barley flour* (9)	1 (11.1)	8 (88.9)	-	16.04	16.4±0.00
Rye flour (6)	2 (33.3)	4 (66.7)	15.6	22.1	18.9±3.24
Chickpea flour (2)	0 (0)	2 (100)	-	-	-
Tarhana (20)	0 (0)	20 (100)	-	-	-

Mean: The arithmetic mean of the measured values.

SD (Standard Deviation): It indicates the extent to which the data are dispersed around the mean.

*The standard deviation (SD) value of 0.00 for barley flour reflects the presence of only a single positive sample; therefore, no variability could be calculated.

Table 2: Fumonisin range of concentrations and respective contamination percentages in different flour types and Tarhana samples.

Samples (n)	<15 mg/kg n (%)	15-30 mg/kg n (%)	30-45 mg/kg n (%)
Wheat flour (31)	31 (100)	-	-
Corn flour (12)	5 (41.7)	4 (33.3)	3 (25.0)
Barley flour (9)	8 (88.9)	1 (11.1)	-
Rye flour (6)	4 (66.7)	2 (33.3)	-
Chickpea flour (2)	2 (100)	-	-
Tarhana (20)	20 (100)	-	-
Total (80)	70 (87.5)	7 (8.75)	3 (3.75)

Table 3: Distribution of fumonisin levels by province.

Sample type	Number of samples	Province					
		Afyonkarahisar		Denizli		Uşak	
		Number of samples n (%)		Number of samples n (%)		Number of samples n (%)	
		Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
Wheat flour	31	0 (0)	10 (100)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	10 (100)
Corn flour	12	2 (50.0)	2 (50.0)	4 (100)	0 (0)	1 (25.0)	3 (75.0)
Barley flour	9	0 (0)	3 (100)	1 (33.3)	2 (66.7)	0 (0)	3 (100)
Rye flour	6	0 (0)	2 (100)	2 (50.0)	2 (50.0)	-	-
Chickpea flour	2	-	-	0 (0)	2 (100)	-	-
Tarhana	20	-	-	0 (0)	20 (100)	-	-

"-": No sample was taken from that province.

Table 4: Fumonisin incidence in different flour types and locations.

n	n ₁ (%)	Flour type	Fumonisin levels(min-max)	Location	References
25	14 (56.0)	Corn flour	257-5580 µg/kg	İstanbul, Türkiye	Ocak and Bostan 2010
135	82 (0)	Wheat flour	-	Türkiye	Kaya and Tosun 2013
	19 (0)	Barley flour	-		
	18 (11.1)	Rye flour	0-103 µg/kg		
	16 (100)	Corn flour	670-1684 µg/kg		
57	45 (78.9)	Corn and corn-based products	118-9589.4 µg/kg	İzmir, Türkiye	Bakırcı 2014
52	46 (88.4)	Corn flour	Mean 140 µg/kg	South Africa	Sydenham et al. 1991
14	9 (64.3)	Corn flour	1.3-15.6 µg/kg	USA	Pestka et al. 1994
12	0 (0)	Wheat flour	-		
18	16 (88.9)	Corn flour	250-1000 µg/kg	USA	Pohland 1996
14	14 (100)	Corn flour	0.5-8.8 µg/kg	People's Republic of China	Groves et al. 1999
9	9 (100)	Corn flour	0.56-4.93 µg/kg	Brazil	Machinski and Valente-Soares 2000
60	60 (100)	Corn flour	590-19230 µg/kg	Brazil	Bittencourt et al. 2005
90	90 (100)	Corn flour	892-6307 µg/kg	Argentina	Castells et al. 2008
41	41 (100)	Corn flour	50.0-1300 µg/kg	Portugal	Martins et al. 2008
17	9 (52.9)	Corn flour	58.2-600 µg/kg	Serbia	Matic et al. 2009
11	1 (9.1)	Soy flour	56.4-56.4 µg/kg		
16	13 (81.3)	Wheat flour	0-400 µg/kg	People's Republic of China	Sun et al. 2011
23	8 (35.0)	Corn flour	0.8-2.4 µg/kg	Argentina	Lerda 2017
48	38 (80.0)	Corn	820-29760 µg/kg	Honduras	Cabrera-Meraz et al. 2021
48	29 (60.0)	Corn flour	660-14360 µg/kg		
48	17 (36.0)	Corn bread	590-12400 µg/kg		
6881	5986 (87.0)	Corn	1390-170300 µg/kg	Mexico Central America	Odjo et al. 2022
53	40 (75.5)	Corn	4-6456 µg/kg	India	Navale and Vamkudoth 2025

n: Number of samples, n₁: Positive samples.

small sample size (n=2) for chickpea flour limits the statistical reliability of this observation and prevents drawing definitive conclusions. This limitation should be considered when interpreting the absence of contamination in this subgroup.

Statistically, although the Chi-square and Fisher's Exact tests confirmed a significant association between flour type and fumonisin formation, the study lacked prior power analysis and formal sample size determination. This could affect the robustness and generalizability of statistical inferences. Additionally, the presence of small subgroup sizes can reduce statistical power and increase

the likelihood of Type II error (β). Therefore, future studies should incorporate appropriate sample size calculations and more balanced sampling strategies to strengthen the validity of the findings.

Fumonisin, which are frequently detected in corn and corn-based products in particular, have been shown to cause pulmonary edema, kidney and liver toxicity in mammals. Additionally, they may contribute to an increase in the incidence of esophageal cancer in people who consume high amounts of corn and corn products contaminated with *Fusarium* species. It is recommended to minimize fumonisin levels in grain and grain products

to prevent economic losses as well as the possible risks of fumonisins on animal and human health (Yalçın and Kart 2018).

Studies from other countries have reported variable fumonisin contamination levels (Table 4). Sydenham et al. (1991) analyzed 52 corn flour samples in South Africa. Fumonisin was detected in 46 of these samples (88.4%) with an average concentration of 140 µg/kg. Pestka et al. (1994) reported that 64.3% of corn flour samples in the USA contained fumonisin in the range of 1.3-15.6 µg/kg, and in another study conducted in the same country by Pohland (1996), 88.9% of corn samples contained fumonisin in the range of 250-1000 µg/kg. In studies in Brazil, where a total of 69 corn flour samples were analyzed, 100% were found to be contaminated with fumonisin (Machinski and Valente-Soares 2000; Bittencourt et al. 2005). Similarly, studies on the presence of fumonisin in corn flour samples in different countries found that all 145 analyzed samples (100%) were contaminated (Groves et al. 1999; Castells et al. 2008; Martins et al. 2008). Matic et al. (2009) analyzed 17 corn flour and 11 soy flour samples in Serbia. It was revealed that 9 (52.9%) of the corn flour samples and 1 (9.1%) of the soy flour samples were contaminated with fumonisin at levels of 58.2-600 µg/kg and 56.4-56.4 µg/kg, respectively. In addition, as a result of studies conducted on the presence of fumonisin in corn flour samples in Argentina and Honduras, it was reported that 35.0% (in the range of 0.8-2.4 µg/kg) and 60.0% (660-14360 µg/kg) were contaminated, respectively (Lerda 2017; Cabrera-Meraz et al. 2021). In a study conducted by Sun et al. (2011) determining fumonisin levels in wheat flour samples, they found that 13 (81.3%) were contaminated in the range of 0-400 µg/kg. These results differ from our study results when it is evaluated that all 31 wheat flour samples analyzed in our study were not contaminated with fumonisin. According to research conducted on corn samples in different countries, fumonisin was found positive in 38 (80.0%) in Honduras, 5986 (87.0%) in Mexico and 40 (75.5%) in India (Cabrera-Meraz et al. 2021; Odjo et al. 2022; Navale and Vamkudoth 2025).

Several factors influence the formation of fumonisins in cereals and cereal products, particularly geographical differences and seasonal conditions, which vary across countries. In addition, the hygienic quality of the raw materials used and the production period play important roles. Various species of *Fusarium* are significant plant pathogens that infect corn and several other crops, resulting in diseases such as ear blight, root rot, and stem injury (Badiwe et al. 2025; Navale and Vamkudoth 2025).

This study investigated fumonisin contamination in different flour types and tarhana. Overall, 12.5% of the samples tested positive for fumonisins. As a potent mycotoxin, fumonisin represents a significant public health concern that should not be overlooked. Several factors influence the formation of mycotoxins in food; the most important of these are environmental conditions (e.g., temperature and humidity), storage environments, and the type of food product in question (Bereziartua et al. 2025).

Fungal contamination in corn grains represents a major concern due to the potential production of toxic mycotoxins that compromise food safety and quality. The findings of this study revealed a considerable likelihood of fumonisin presence in maize samples, with certain samples surpassing the allowable regulatory limits. These results highlight the importance of early screening for

mycotoxin-producing fungi and the implementation of ongoing surveillance systems to prevent adverse and potentially irreversible health effects in humans and animals.

Cereals and cereal products are staple foods worldwide, and fumonisin contamination remains a persistent threat across different flour types. The high contamination levels reported in many studies highlight the need for strict control and preventive measures.

Preventive strategies should begin at the raw material production stage. Cereals must be thoroughly dried to inhibit mold growth and should not be stored under hot and humid conditions. Regular monitoring of fumonisin levels is essential, and producers should be educated on hygienic practices to ensure safer production environments. Implementing these measures will contribute to reducing fumonisin contamination and safeguarding both food quality and public health.

To our knowledge, this is the first study to investigate fumonisin contamination in tarhana, a traditional fermented cereal-based food widely consumed in Türkiye. The absence of fumonisins in all tarhana samples analyzed is a reassuring finding, suggesting that either the raw materials used or the fermentation and drying processes may reduce fumonisin risk. This result contributes valuable new insights into food safety risks associated with traditional cereal-based products and highlights the need for continued surveillance across diverse food categories.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank the Department of Food Hygiene and Technology, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, for their support.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Idea/Concept: ÖÇ, UA, DAA
Supervision/Consultancy: ZG, RK
Data Collecting and/or Processing: AS, FK, TL
Analysis and/or Interpretation: ÖÇ, UA, DAA, AS, FK, TL
Writing the Article: ÖÇ, UA, DAA
Critical Review: ÖÇ, UA, DAA, ZG, AS, FK, RK, TL

REFERENCES

- Andrade PD (2023).** Dietary risk assessment for fumonisins: challenges and prospects. *Curr Opin Food Sci*, 54, 101080.
- Badiwe M, Fialho RO, Stevens C, Lombard PH, van Niekerk J (2025).** *Fusarium* species associated with diseases of citrus: a comprehensive review. *J Fungi*, 11(4), 263.
- Bakurcı GT (2014).** Tahıl ve tahıl ürünlerinin aflatoksin, okratoksin A, zearalenon, fumonisin ve deoksinivalenol mikotoksinleri yönünden incelenmesi. *Akademik Gıda*, 12(2), 45-56.
- Bereziartua A, Huss A, Kers JG et al. (2025).** Pre-harvest aflatoxin contamination in crops and climate change factors: A European overview. *Toxins*, 17(7), 344.
- Bittencourt ABF, Oliveira CAFD, Dilkin P, Correa B (2005).** Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. *Food Control*, 16(2), 117-120.
- Cabrera-Meraz J, Maldonado L, Bianchini A, Espinal R (2021).** Incidence of aflatoxins and fumonisins in grain, masa and corn tortillas in four municipalities in the department of Lempira, Honduras. *Heliyon*, 7(12), e08506.

- Castells M, Marín S, Sanchis V, Ramos AJ (2008). Distribution of fumonisins and aflatoxins in corn fractions during industrial cornflake processing. *Int J Food Microbiol*, 123, 81-87.
- European Commission (2023). Commission Regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006. *OJEU* 119. 5 May, pp. 103-157.
- EFSA (European Food and Safety Authority). (2018). Scientific opinion on the appropriateness to set a group health-based guidance value for fumonisins and their modified forms. *EFSA J*, 16(2), 5172.
- Groves FD, Zhang L, Chang YS et al. (1999). *Fusarium* mycotoxins in corn and corn products in a high-risk area for gastric cancer in Shandong Province, China. *JAOC Int*, 82(3), 657-662.
- Humpf HU, Voss KA (2004). Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins. *Mol Nutr Food Res*, 48(4), 255-269.
- Kanabus J, Bryła M, Leśnowolska-Wnuczek K, Waśkiewicz A, Twarużek M (2025). Mycotoxin occurrence in herbs, spices, and dietary supplements, and their exposure assessment. *Toxins*, 18(1), 20.
- Karbancıoğlu-Güler F, Heperkan D (2009). Natural occurrence of fumonisin B1 in dried figs as an unexpected hazard. *Food Chem Toxicol*, 47(2), 289-292.
- Kaya SB, Tosun H (2013). Occurrence of total aflatoxin, ochratoxin A and fumonisin in some organic foods. *J Pure Appl Microbiol*, 7(4), 2925-2932.
- Khan R, Anwar F, Ghazali FM (2024). A comprehensive review of mycotoxins: Toxicology, detection, and effective mitigation approaches. *Heliyon*, 10(8), e28361.
- Khattoon T, Maity M (2025). Attribute Enhancement of Cereals by Enriching Phytochemicals: A Review. Maity M (Ed). *Revolutionary Approaches in Food Science, Technology and Processing* (pp. 65-78). Swami Vivekananda University Press, West Bengal.
- Lerda D (2017). Fumonisin in foods from Cordoba (Argentina), presence: mini review. *Toxicol Open Access*, 3(2), 1-4.
- Ma J, Guo X (2025). A comprehensive review on optical and electrochemical aptasensor for detection of fumonisin B1. *Front Nutr*, 12, 1596673.
- Machinski M, Valente-Soares LM (2000). Fumonisin B1 and B2 in Brazilian corn-based food products. *Food Addit Contam*, 17(10), 875-879.
- Martins HM, Almeida I, Marques MF, Guerra MM (2008). Fumonisin and deoxynivalenol in corn-based food products in Portugal. *Food Chem Toxicol*, 46(7), 2585-2587.
- Matic JJ, Mastilovic J, Cabarkapa I, Mandic A (2009). Mycotoxins as a risk in the grain food. *Matica Srpska J Nat Sci*, 117, 79-86.
- Navale VD, Sawant AM, Gowda VU, Vamkudoth KR (2022). Assembly, annotation, and comparative whole genome sequence of *Fusarium verticillioides* isolated from stored maize grains. *Pathogens*, 11, 810.
- Navale VD, Vamkudoth KR (2025). Development of multiplex PCR assay for detection of mycotoxigenic *Fusarium* species contamination in stored maize grains, India. *The Microbe*, 6, 100240.
- Ocak AÖ, Bostan K (2010). İstanbul'da satışa sunulan mısır bazı gıdalarda fumonisin varlığı. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg*, 36(2), 47-52.
- Odjo S, Alakonya AE, Rosales-Nolasco A et al. (2022). Occurrence and postharvest strategies to help mitigate aflatoxins and fumonisins in maize and their co-exposure to consumers in Mexico and Central America. *Food Control*, 138, 108968.
- Pestka JJ, Azcona-Olivera JI, Plattner RD et al. (1994). Comparative assessment of fumonisin in grain-based foods by ELISA, GC-MS, and HPLC. *J Food Prot*, 57(2), 169-172.
- Pohland AE (1996). Occurrence of Fumonisin in the U.S. Food Supply. Jackson LS, DeVries JW, Bullerman LB (Ed). *Fumonisin in Food* (pp. 19-26). Springer Science+Business Media, New York.
- Reinhold A, Gessner AL, Scherlach K et al. (2024). Maize flour processing determines the fumonisin intake of south Malawi residents. *J Food Process Preserv*, 2024(1), 8785591.
- Schieszl T, Jozwiak A, Süth M et al. (2025). Fumonisin intake from consumption of wheat-and corn-based products in Hungary. *Toxins*, 17(12), 566.
- Sun G, Wang S, Hu X et al. (2011). Co-contamination of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in food and human dietary exposure in three areas of China. *Food Addit Contam*, 28(4), 461-470.
- Sydenham EW, Shephard GS, Thiel PG, Marasas WF, Stockenstrom S (1991). Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. *J Agric Food Chem*, 39(11), 2014-2018.
- Szabo A, Peter M, Balogh G et al. (2025). Liver lipidomics, histology, transcriptomics, and clinical chemistry of rats intraperitoneally treated with fumonisin B1 for 5 days. *J Agric Food Chem*, 73(39), 24975-24996.
- Tarım ve Orman Bakanlığı (2023). Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği. *Resmî Gazete*, 5 Kasım 2023, Sayı: 32360.
- Tsouloufi TK (2024). An overview of mycotoxins in rabbits. *J Vet Diagn Invest*, 36(5), 638-654.
- Yalçın R, Kart A (2018). Fumonisinler: İnsan ve hayvan sağlığı üzerine olumsuz etkileri. *MAKÜ Sağ Bil Enst Derg*, 6(2), 95-108.
- Yazar G, Kokini JL (2025). Recent advances in the assessment of cereal and cereal-based product quality. *Foods*, 14(7), 1220.



Antinociceptive and Anti-inflammatory Efficacy of Oleic and Linoleic Acid Application

Ahmet Cihat ÖNER^{1,*} Esin AKARSU ORUNÇ²

¹ Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, 65080, Van, Türkiye

² Van Yüzüncü Yıl University, Van Health Services Vocational School, Department of Pharmacy Services, 65080, Van, Türkiye

Received: 16.04.2026

Accepted: 22.06.2026

ABSTRACT

The present study aimed to comparatively evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory effects of oleic acid (OA) and linoleic acid (LA), administered individually and in combination, and to investigate their impact on serum pro-inflammatory cytokines in an experimental animal model. A total of 96 rats were orally treated with OA (45–90 mg/kg), LA (45–90 mg/kg), OA + LA (45+45 mg/kg and 90+90 mg/kg), standard analgesics (indomethacin and acetylsalicylic acid, ASA), or vehicle control. The antinociceptive properties were examined through Tail Flick, Hot Plate, and writhing test induced by acetic acid injection, whereas the anti-inflammatory properties were examined through carrageenan-induced paw edema. The concentrations of TNF- α and IL-1 β in serum were determined by ELISA. OA demonstrated statistically significant antinociceptive effects in both central and peripheral pain models, exhibiting efficacy comparable to ASA. In contrast, LA alone did not produce significant analgesic effects. Notably, co-administration of OA and LA attenuated the analgesic efficacy observed with OA alone. In the carrageenan-induced inflammation model, both OA and OA + LA significantly reduced paw edema, with effects comparable to indomethacin, whereas LA alone showed limited anti-inflammatory activity. Biochemically, both OA and LA significantly elevated serum TNF- α levels, while no significant differences were observed among groups in IL-1 β levels. These findings suggest that OA possesses pronounced antinociceptive and anti-inflammatory properties. However, the reduced efficacy observed with combined administration and the elevation of cytokines indicate that OA and LA might work via different pathways, thus warranting further investigation into their dose-dependent interactions.

Keywords: Anti-inflammatory, Antinociceptive, Interleukin-1 beta, Linoleic acid, Oleic acid, TNF alpha.

öz

Oleik ve Linoleik Asit Uygulamasının Antinosiseptif ve Antiinflamatuvar Etkinliği

Bu çalışmanın amacı, oleik asit (OA) ve linoleik asidin (LA) ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulandığında ağrı kesici ve antiinflamatuvar etkilerini karşılaştırmalı olarak değerlendirmek ve deneysel bir hayvan modelinde serum proinflamatuvar sitokinler üzerindeki etkilerini araştırmaktır. Toplam 96 Sprague-Dawley sıçanına oral yolla OA (45–90 mg/kg), LA (45–90 mg/kg), OA + LA (45+45 mg/kg ve 90+90 mg/kg), standart analjezikler (indometasin ve asetilsalisilik asit, ASA) veya kontrol grubu olarak taşıyıcı madde uygulandı. Ağrı kesici aktivite, Kuyruk Sıçratma, Sıcak Plaka ve asetik asit kaynaklı kıvrınma testleri kullanılarak değerlendirilirken, antiinflamatuvar etkiler karagenan kaynaklı pençe ödemi modeli ile değerlendirildi. Tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) ve interlekin-1 beta (IL-1 β) serum düzeyleri ELISA kullanılarak ölçüldü. OA, hem merkezi hem de periferik ağrı modellerinde istatistiksel olarak anlamlı antinosiseptif etkiler gösterdi ve ASA ile karşılaştırılabilir bir etkinlik sergiledi. Buna karşılık, LA tek başına anlamlı analjezik etkiler üretmedi. Özellikle, OA ve LA'nın birlikte uygulanması, yalnızca OA ile gözlemlenen analjezik etkinliği azalttı. Karagenan kaynaklı inflamasyon modelinde, hem OA hem de OA + LA, indometasin ile karşılaştırılabilir etkilerle pençe ödemi önemli ölçüde azalttı, oysa LA tek başına sınırlı antiinflamatuvar aktivite gösterdi. Biyokimyasal olarak, hem OA hem de LA serum TNF- α düzeylerini önemli ölçüde yükseltirken, IL-1 β düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Bu bulgular, OA'nın belirgin antinosiseptif ve anti-inflamatuvar özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. Ancak, kombine uygulamada gözlemlenen azalmış etkinlik ve pro-enflamatuvar sitokinlerin yükselmesi, OA ve LA'nın etkilerini farklı moleküler mekanizmalar aracılığıyla gösterebileceğini ve doz bağımlı etkileşimleri ve altta yatan yollar hakkında daha fazla araştırma yapılmasını gerektirdiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Antiinflamatuvar, Antinosiseptif, İnterlökün-1 Beta, Linoleik asit, Oleik asit, TNF-alfa.



INTRODUCTION

Türkiye, with its rich biodiversity, hosts numerous herbal sources used in traditional medicine. The increasing interest in herbal products stems from their fewer side effects, multiple therapeutic actions, and economic advantages compared to synthetic drugs (Çoban 2003). Particularly, the long-term administration of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), widely employed in the treatment of chronic pain and inflammation, is linked to serious adverse effects such as tolerance development, gastrointestinal toxicity, and renal toxicity, necessitating alternative therapeutic approaches (Bozkurt et al. 2017; Sohail et al. 2023).

Pain is a complex sensory experience resulting from the stimulation of receptors called nociceptors, transmitted from somatic or visceral tissues to the spinal cord, and then to the thalamus and cerebral cortex (Sunzini et al., 2023). Inflammation, on the other hand, is a complex biological response occurring in tissues in response to trauma, infection, or autoimmune damage, aiming to eliminate the damaging agent, limit harm, and facilitate the repair of damaged tissue (Guyton and Hall 2001). In these processes, soluble factors such as the pro-inflammatory cytokines Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) and Interleukin-1 beta (IL-1 β) play a central role (van der Poll et al. 1999).

Oleic acid (OA) and linoleic acid (LA) are unsaturated fatty acids that constitute the main components of many vegetable oils, such as olive oil, sunflower oil, and walnut oil. OA is a monounsaturated fatty acid that is renowned for its antioxidant and anti-inflammatory properties. It reduces the susceptibility of cells to oxidation by decreasing the formation of pro-inflammatory molecules (Asif 2011; Santa-Maria et al. 2023). LA, a polyunsaturated fatty acid (PUFA), is an essential fatty acid. However, current literature suggests that high dietary LA intake may increase pain susceptibility by leading to the accumulation of arachidonic acid (AA)-derived pro-nociceptive lipid mediators (e.g., prostaglandins and leukotrienes) (Ramsden et al. 2016; Birkic et al. 2022).

This study aimed to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory efficacy of OA and LA in vivo and to elucidate their molecular interactions by examining changes in cytokine levels.

MATERIAL AND METHODS

In this study, a total of 96 Sprague Dawley rats were used, randomly divided into 16 different groups, with 6 healthy rats in each group. All animals were housed under standard laboratory conditions (22 $\pm$ 2°C, 50-60% humidity, 12-hour light/dark cycle) and had ad libitum access to food and water. The study received ethical approval from the Van Yüzüncü Yıl University Animal Experiments Local Ethics Committee (YUHADYEK) with protocol number 2019/06 on 27/06/2019.

Chemicals and Drugs

The chemicals used in the experiments were:

- Pain Inducer: Acetic acid (Sigma 320099).
- Test Substances: Oleic acid (OA, AB 333867, abcr Germany), Linoleic acid (LA, BLA 100448, Boston USA Academy; USA).
- Reference Drugs: Indomethacin (Sigma I7378), Acetylsalicylic acid (ASA).
- Inflammation Inducer: 1% lambda carrageenan solution.

- Biochemical Kits: Rat TNF- α ELISA kit (BT lab, Cat no: E0764Ra), Rat IL-1 β ELISA kit (BT Lab, Cat No: E0119Ra).

Experimental Groups and Administration

Study groups were arranged separately for antinociceptive and anti-inflammatory efficacy tests (n=6) (Table 1 and 2). All administrations were performed orally (p.o.). The doses of 45 mg/kg and 90 mg/kg were selected based on previously reported in vivo studies. Ramsden et al. (2016) and Hidalgo et al. (2021) demonstrated that fatty acid doses in the range of 40–100 mg/kg produced measurable pharmacological effects in rodent models without overt toxicity. The lower dose (45 mg/kg) was chosen to reflect a physiologically relevant intake level, while the higher dose (90 mg/kg) was included to assess potential dose-dependent effects and to align with established dose-escalation paradigms used in similar preclinical fatty acid studies.

Table 1: Groups for Antinociceptive Experiments.

Group No	Application (Oral)	Dose (mg/kg)
1	Control (Physiological Saline)	0.2 ml
2	Acetylsalicylic Acid (ASA)	300
3	Oleic Acid (OA)	45
4	Oleic Acid (OA)	90
5	Linoleic Acid (LA)	45
6	Linoleic Acid (LA)	90
7	OA + LA (Combined Low Dose)	45 + 45
8	OA + LA (Combined High Dose)	90 + 90

All test substances and reference drugs were administered 30 minutes before pain experiments. n = 6 animals per group. All substances were administered orally (p.o.) 30 minutes before pain tests. OA: oleic acid; LA: linoleic acid; ASA: acetylsalicylic acid; p.o.: per os (oral administration).

Table 2. Groups for Anti-inflammatory Experiments.

Group No	Application (Oral)	Dose (mg/kg)
1	Control (Physiological Saline)	0.2 ml
2	Indomethacin (Reference)	3
3	Oleic Acid (OA)	45
4	Oleic Acid (OA)	90
5	Linoleic Acid (LA)	45
6	Linoleic Acid (LA)	90
7	OA + LA (Combined Low Dose)	45 + 45
8	OA + LA (Combined High Dose)	90 + 90

n = 6 animals per group. Substances were administered to all groups except the control and indomethacin groups after carrageenan application. OA: oleic acid; LA: linoleic acid; p.o.: per os (oral administration).

Substances were administered to all groups except the control and indomethacin groups after carrageenan application.

Experimental Pain Models

Antinociceptive Efficacy

Three different models were used to evaluate central and peripheral antinociceptive efficacy:

The tail flick test assessed the pain response at the central spinal cord level using the D'Amour and Smith (1941) technique. Radiant heat was applied to a specific area on the rat's tail, and the amount of time taken for the rat to withdraw its tail (latency) was recorded. The maximum time of exposure was set at 30 seconds. Measurements of the withdrawal response were made each time before drug administration (baseline) and again 30, 60, and 90 minutes after drug administration.

The hot plate test assessed the pain response at the central supraspinal level using modifications of the Eddy and Leimbach (1953) technique. Rats were placed on a hot plate ($55 \pm 0.1^\circ\text{C}$) and the time taken for each rat to lick or withdraw its paw from the hot plate (latency), was recorded. If the rat did not lick or withdraw its paw from the plate within 30 seconds after being placed on the hot plate, the measurement was terminated (cut-off time). Measurements of the time to lick or withdraw a paw from the hot plate were made each time before drug administration (baseline) and were repeated 30, 60, and 90 minutes after drug administration.

The acetic acid-induced writhing test was conducted as per the methods of Koster et al. (1989). Five (5) minutes after receiving an intraperitoneal injection of 0.6% acetic acid (0.1 ml/10 g) rats were observed for 10 minutes for the number of writhing movements (bending of the back, abdominal muscle contraction, stretching, and extending).

Anti-inflammatory Activity Determination

Carrageenan-Induced Paw Edema Test: We used the method of Winter et al. (1962) to evaluate carrageenan-induced paw edema, with some modifications from the original protocol. The right rear paw of each rat was measured using a plethysmometer before the administration of the drug. After thirty minutes of drug administration, inflammation was induced by injecting 100 μL of a 1% solution of lambda-carrageenan into the subplantar region of the right rear paw. The volume of the paw was re-measured 1, 2 and 3 hours post-injection. The degree of inhibition of the inflammatory response was calculated as a percentage of the inflammatory response and was calculated using the following formula (Kouadio et al. 2000):

$$\%I = [1 - dt/dc] \times 100$$

%I = Percentage inhibition

dt = Volume difference in the paw of the drug-treated group

dc = Volume difference in the paw of the control group

Biochemical Analyses

At the end of the experiment, serum samples obtained from the blood of rats were used to measure TNF- α and IL-1 β levels using commercial ELISA kits. Analyses were performed according to kit procedures, and results were detected using an ELISA reader.

Statistical Analysis

The collected data have been expressed as mean and standard error of mean (Mean $\pm$ SE). Within the framework of ANOVA assumptions, the normality of the data distribution was examined using the Shapiro-Wilk test, and the homogeneity of variances was examined using Levene's test. Data from all groups showed a normal distribution, and the variances were found to be homogeneous. Duncan's multiple range test was used for multiple comparisons. Statistical analyses were carried out using IBM SPSS 22.0 software, and statistical significance was set at a p-value < 0.001.

RESULTS

Findings related to Antinociceptive Efficacy

Groups treated with Oleic Acid (OA) showed pain tolerance (increase in latency time) equivalent to the reference drug ASA in both Tail Flick and Hot Plate tests. The antinociceptive effect of Linoleic Acid (LA) alone was lower compared to OA. Combined applications yielded

results similar to the effect shown by OA alone, while LA's combined use was observed to slightly reduce OA's efficacy.

OA application significantly reduced the number of writhes in the peripheral pain model (Acetic Acid Writhing Test) compared to the control group. This effect was found to be similar to that of ASA. While LA alone had a weak effect, combined groups yielded results similar to the effect of OA alone (Figure 1).

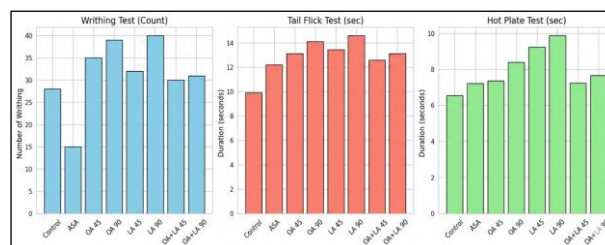


Figure 1: Group means for Writhing, Tail Flick, and Hot Plate tests.

Effects on Cytokine Levels (After Antinociceptive Experiment)

When TNF- α levels were examined, a statistically significant difference was found between the control group and all treatment groups ($p < 0.001$). Compared to the control group, a statistically significant increase in serum TNF- α levels was observed with both OA and LA applications. Although the reference drug ASA showed a slight increase compared to the control group, it exhibited a significantly lower pro-inflammatory profile than the fatty acid groups.

There was no statistically significant difference in IL-1 β levels between the control, ASA, LA (45) and combined (45) groups ($p > 0.05$). However, it was determined that the groups in which high dose OA was administered alone and in combination were unable to reduce IL-1 β levels yet were statistically different compared to the control group ($p < 0.001$) (Figure 2, Table 3).

Table 3. Serum TNF- α and IL-1 β Levels (Mean $\pm$ SE) after Antinociceptive Experiments

Experiment Group	TNF- α (pg/mL) (Mean $\pm$ SE)	IL-1 β (pg/mL) (Mean $\pm$ SE)
Control	50.18 $\pm$ 3.66 ^a	333.32 $\pm$ 36.69 ^a
Acetylsalicylic Acid (ASA)	65.09 $\pm$ 6.19 ^b	395.76 $\pm$ 56.21 ^{ab}
Oleic Acid (OA) 45	78.42 $\pm$ 8.46 ^{cd}	488.11 $\pm$ 75.13 ^{bcd}
Oleic Acid (OA) 90	95.62 $\pm$ 7.36 ^e	678.45 $\pm$ 77.34 ^e
Linoleic Acid (LA) 45	80.99 $\pm$ 4.01 ^{cd}	436.51 $\pm$ 48.43 ^{abc}
Linoleic Acid (LA) 90	100.10 $\pm$ 4.52 ^e	538.84 $\pm$ 49.14 ^{cd}
OA + LA (45)	71.74 $\pm$ 5.81 ^{bc}	463.83 $\pm$ 66.62 ^{abcd}
OA + LA (90)	89.01 $\pm$ 6.11 ^{de}	591.52 $\pm$ 68.70 ^{de}
p value	$p < 0.001$	$p < 0.001$

Data are presented as Mean $\pm$ SEM (n = 6 per group). Intergroup differences were analyzed using One-way ANOVA and Duncan's multiple comparison test. There was no statistically significant difference between means sharing the same letter ($p > 0.05$). Statistical significance was set at $p < 0.001$. TNF- α : $p < 0.001$ across groups; IL-1 β : $p < 0.001$ across groups. SEM: standard error of the mean; ANOVA: analysis of variance.

Anti-inflammatory Efficacy Findings

In the carrageenan-induced paw edema model, the edema formed in the first hour was significantly reduced by OA and combined applications compared to indomethacin. The effect of LA alone was not as strong as OA and combined applications. By the end of the 3rd hour, high-

dose combined application (OA 90 + LA 90 mg/kg) was determined to reduce paw edema to a degree similar to the reference drug indomethacin. These results indicate that OA and combined application have a strong inhibitory effect on acute inflammation (Figure 3).

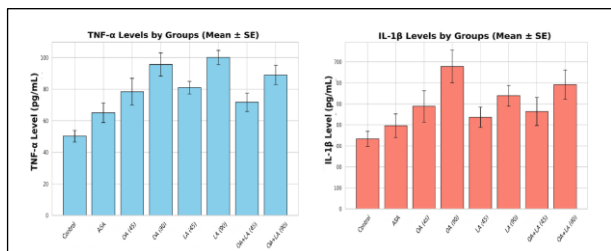


Figure 2: Changes in TNF- α and IL-1 β levels in Antinociceptive efficacy with Oleic and Linoleic acid application.

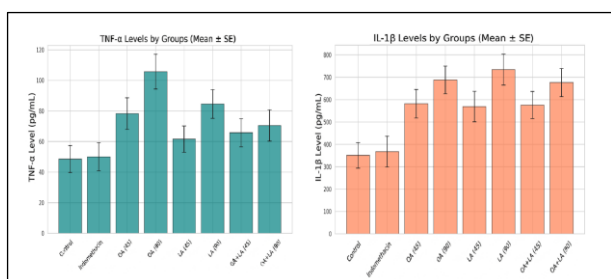


Figure 3: Paw increase graphs with Oleic and Linoleic acid application.

Effects on Cytokine Levels (After Anti-inflammatory Experiment)

In TNF- α measurements, the OA 90 group showed the most significant and distant deviation from the Control and Indomethacin groups ($p < 0.001$). The LA 90 group showed a numerical increase compared to the control and indomethacin groups, although not as significant as the OA 90 group, and this increase was statistically significant. No significant difference was observed in the combined groups ($p > 0.05$). It was observed that all other treatments did not reduce IL-1 β levels and there was no statistically significant difference between the control group and the indomethacin group ($p > 0.05$) (Figure 4, Table 4).

Table 4: Serum TNF- α and IL-1 β Levels (Mean $\pm$ SE) after Anti-inflammatory Experiment.

Experiment Group	TNF- α (pg/mL) (Mean $\pm$ SE)	IL-1 β (pg/mL) (Mean $\pm$ SE)
Control	48.57 $\pm$ 8.72 ^a	350.97 $\pm$ 57.25 ^a
Indomethacin	50.06 $\pm$ 9.24 ^a	367.72 $\pm$ 68.78 ^a
Oleic Acid (OA) 45	78.27 $\pm$ 10.34 ^b	581.46 $\pm$ 63.19 ^{bc}
Oleic Acid (OA) 90	105.68 $\pm$ 11.34 ^c	688.34 $\pm$ 62.19 ^{bc}
Linoleic Acid (LA) 45	61.59 $\pm$ 8.67 ^{ab}	569.19 $\pm$ 68.27 ^b
Linoleic Acid (LA) 90	84.57 $\pm$ 9.37 ^{bc}	734.32 $\pm$ 69.27 ^c
OA + LA (45)	65.74 $\pm$ 9.23 ^{ab}	575.55 $\pm$ 60.45 ^{bc}
OA + LA (90)	70.50 $\pm$ 10.23 ^{ab}	676.33 $\pm$ 62.45 ^{bc}
p value	$p < 0.001$	$p < 0.001$

Data are presented as Mean $\pm$ SEM (n = 6 per group). Intergroup differences were analyzed using One-way ANOVA and Duncan's multiple comparison test. There was no statistically significant difference between means sharing the same letter ($p > 0.05$). Statistical significance was set at $p < 0.001$. TNF- α : $p < 0.001$ across groups; IL-1 β : $p < 0.001$ across groups. SEM: standard error of the mean; ANOVA: analysis of variance.

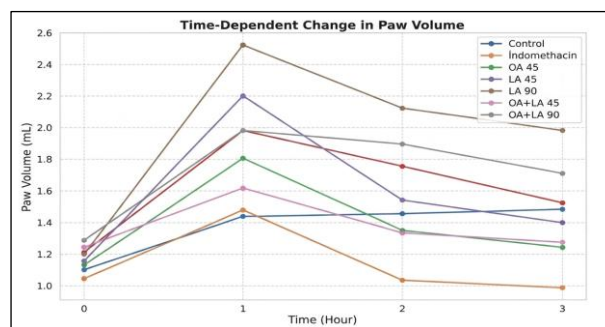


Figure 4: Changes in TNF- α and IL-1 β levels in Anti-inflammatory efficacy with Oleic and Linoleic acid application.

DISCUSSION AND CONCLUSION

This study is a significant investigation that comparatively examined the effects of oleic acid (OA) and linoleic acid (LA) on experimentally induced pain and inflammation in rats, alongside reference drugs and cytokine levels. The findings support the potent antinociceptive and anti-inflammatory potential of OA, while indicating that the effect of LA alone is limited, and combined application reveals notable cytokine modulations.

OA's demonstration of efficacy equivalent to the reference drug ASA in both central (Tail Flick, Hot Plate) and peripheral (Acetic Acid Writhing) pain models highlights the therapeutic potential of this monounsaturated fatty acid. The literature reports that OA can inhibit nociceptive signaling by acting through free fatty acid receptor 1 (FFAR1/GPR40) and reduce the sensitivity of the TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) channel (Pessina et al. 2024; Sendetski et al. 2024). These mechanisms may explain the potent antinociceptive effect observed in our study at the molecular level.

In the carrageenan-induced paw edema model, OA and combined applications reduced edema to a level similar to indomethacin, indicating that OA is effective in the early phases of acute inflammation. This effect can be associated with OA's ability to modulate cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase (LOX) pathways or inhibit nuclear factor kappa B (NF- κ B) activation (Santa-María et al. 2023).

In our study, the weak antinociceptive effect of LA alone and its slight reduction of OA's effect in combined application is a critical finding consistent with current literature. LA (n-6 PUFA) serves as a precursor to arachidonic acid (AA) and subsequently to pro-inflammatory and pro-nociceptive lipid mediators (e.g. PGE₂, LTB₄) in the body (Ramsden et al. 2016; Santin et al. 2023). Evidence suggesting that high dietary LA intake can increase pain susceptibility by increasing plasma accumulation of pro-nociceptive lipid mediators (Birkic et al. 2022) supports the limited efficacy of LA and the potential antagonistic effect in combined application observed in our study.

Inflammation can be described as interactions between soluble factors and cells that may occur in tissues in response to trauma, infection, ischemia, toxic, or autoimmune injury. If the destructive and repair-supporting stages do not proceed smoothly, leukocytes, lymphocytes, or collagen can cause permanent damage to the tissue. The aim here is to eliminate the damaging agent and its products, to keep the damage within limits, and to enable the repair and regeneration of damaged tissue (Guyton and Hall 2001).

Cytokines are known as the first indicators of the body's immune response against microbial attacks in bacterial, viral, fungal, and parasitic infections in many animal models, and TNF- α and IL-1 β are stimulated first as cytokines in inflammation (van der Poll et al. 1999). Cytokines such as IL-1 β and IL-6 lead to the formation of pro-inflammatory and inflammatory changes and the emergence of a rapid immune response that ensures the elimination of pathogens (Bethua et al. 1992). TNF- α and IL-1 β are known to act through similar common signaling molecules that emerge in the early period of inflammation.

In our study, it was observed that oleic acid-linoleic acid and aspirin, used as NSAID preparations, increased TNF- α levels in terms of analgesic effect. Compared to the control group, a statistically significant increase in serum TNF- α levels was observed in oleic and linoleic acid applications ($p < 0.001$). In combined applications, serum TNF- α levels were found to be higher than in acetylsalicylic acid, and it was determined that there was no statistically significant difference in low-dose combined application ($p > 0.05$), but there was a difference in high-dose application ($p < 0.001$). When IL-1 β levels were examined, no statistically significant difference was found between the control, acetylsalicylic acid, linoleic acid (45), and combined (45) groups; this indicates that these applications provided a value close to the control ($p > 0.05$). There was a significant difference between the groups in which oleic acid applications were given alone and in combination at high doses, and it can be said that they were not effective in treatment compared to the control ($p < 0.001$). Although there was a statistically significant difference between the LA (90) group and the control and ASA groups, it can be said that it was not effective in treatment. From an anti-inflammatory perspective, when examining the increase and decrease in paw edema volume, it was observed that paw edema, which increased in the first hour due to the carrageenan effect, decreased with the applications compared to indomethacin. However, linoleic acid application alone was less effective than oleic acid and combined applications. In terms of cytokine levels, it was observed that the applications caused an increase in TNF- α levels after indomethacin-induced inflammation and created a statistically significant difference ($p < 0.001$). For TNF- α levels, linoleic acid, combined 45 and combined 90 applications were not statistically different compared to indomethacin and the control group ($p > 0.05$), while the other applications were statistically different ($p < 0.001$). In terms of IL-1 β levels, it was observed that the applications did not decrease IL-1 β levels and were statistically different from the control group and the indomethacin group ($p < 0.001$).

One of the most striking findings of the study is that OA and LA applications caused a statistically significant increase in serum TNF- α levels after the antinociceptive experiment. This finding contradicts the widespread acceptance that OA generally has anti-inflammatory effects (Santa-Maria et al. 2023). However, this contradiction should be evaluated in the context of dose-response relationships and duration of application. The literature indicates that OA may exhibit anti-inflammatory effects at low doses, while at high doses or in different cellular contexts, it may trigger the release of pro-inflammatory cytokines (Hidalgo et al. 2021). It is thought that the doses used in our study (45 and 90 mg/kg) might have exceeded this pro-inflammatory threshold. Cytokine levels are indicative of an acute response. While antinociceptive tests measure acute effects, the increase in cytokines may be due to the acute modulatory effect of fatty acids on

immune cells. LA being a precursor to pro-inflammatory lipid mediators may have contributed to the increase in TNF- α in combined application and LA alone groups.

In this study, after the anti-inflammatory experiment, LA and combined groups were observed to manage TNF- α levels more successfully compared to control and indomethacin. This situation suggests that in the carrageenan-induced inflammation model, the anti-inflammatory mechanisms of fatty acids (e.g., FFAR1 activation or NF- κ B inhibition) become more pronounced. The inability to achieve a general reduction in IL-1 β levels indicates that the modulation of this cytokine is more complex or requires different signaling pathways.

Several limitations of the present study should be acknowledged. First, the sample size of six animals per group is relatively small, which may limit the statistical power and generalizability of the findings. Second, only two pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) were measured; a broader cytokine panel including IL-6, IL-10, and PGE2 would provide a more comprehensive picture of the inflammatory response. Third, histopathological analysis of target tissues was not performed, which would have provided direct morphological evidence of inflammatory changes. Fourth, key mechanistic markers such as cyclooxygenase-2 (COX-2), nuclear factor kappa B (NF- κ B) and prostaglandin E2 (PGE2) were not assessed, leaving the molecular pathways underlying the observed effects incompletely characterized. Finally, only acute (single-dose) administration was evaluated; the effects of repeated or long-term treatment with OA and LA remain unknown and warrant investigation in future studies.

In conclusion, it was concluded that oleic acid application, both alone and in combination with linoleic acid, may be effective in reducing inflammation. It is thought that it may be beneficial to examine efficacy in more detail in future antinociceptive or different pain model studies. However, compared to acetylsalicylic acid, whose efficacy was determined and compared at the antinociceptive efficacy level, the efficacy of oleic and linoleic acid was found to be considerable. However, due to the increase in serum cytokine levels, it was thought that oleic acid and linoleic acid stimulated inflammatory markers, and although they were effective in acute pain relief, it would be more appropriate to investigate these effects with different studies and different doses.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest for this study.

ACKNOWLEDGMENT

The present research was sponsored by the Van Yuzuncu Yil University Research Projects Directorate (Project no: TDK-2020-8697).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Idea/Concept: ACÖ
Supervision/Consultancy: ACÖ, EAO
Data Collection and/or Processing: ACÖ, EAO
Analysis and/or Interpretation: ACÖ
Writing the Article: ACÖ, EAO
Critical Review: ACÖ

REFERENCES

- Asif M (2011).** Health effects of omega-3,6,9 fatty acids: Perilla frutescens is a good example of plant oils. *Orient Pharm Exp Med*, 11(1), 51-59.
- Bethea JR, Gillespie GY, Benveniste EN (1992).** Interleukin-1 β induction of TNF- α gene expression: Involvement of protein kinase C. *J Cell Physiol*, 152(2), 264-273.
- Birkic N, Azar T, Maddipati KR, et al (2022).** Excessive dietary linoleic acid promotes plasma accumulation of pronociceptive fatty acyl lipid mediators. *Sci Rep*, 12(1), 17832.
- Bozkurt İ, Dilek E, Erol HS et al. (2017).** Investigation on the effects of pomiferin from *Maclura pomifera* on indomethacin-induced gastric ulcer: An experimental study in rats. *Med Chem Res*, 26, 2048-56.
- Çoban T, Çitoğlu GS, Sever B et al. (2003).** Antioxidant Activities of Plants Used in Traditional Medicine in Turkey. *Pharm Biol*, 41(8), 608-613.
- D'Amour FE, Smith, DL (1941).** A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther*, 72(1), 74-79.
- Eddy NB, Leimbach D (1953).** Synthetic analgesics: II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines, *J Pharmacol Exp Ther*, 107(3), 385-393.
- Guyton A, Hall J (2001).** Medical Physiology. 14th Edition, Nobel Medical Bookstore. Istanbul.
- Hidalgo MA, Carretta MD, Burgos RA (2021).** Long Chain Fatty Acids as Modulators of Immune Cells Function: Contribution of FFA1 and FFA4 Receptors. *Front Physiol*, 1;12:668330.
- Koster R, Anderson, M, De Beer EJ. (1959).** Acetic Acid for Analgesic Screening. *Fed Proc*, 18, 412-417.
- Kouadio F, Kanko C, Juge M (2000).** Analgesic and antiinflammatory activities of an extract from *Parkia biglobosa* used in traditional medicine in the Ivory Coast. *Phytother Res*, 14(8), 635-637.
- Pessina F, Casini I, Gamberucci A, et al. (2024).** Anti-Inflammatory and Antinociceptive Properties of the Quercetin-3-Oleate AV2, a Novel FFAR1 Partial Agonist. *Int J Mol Sci*, 25(21), 11635.
- Ramsden CE, Ringel A, Majchrzak-Hong SF, et al. (2016).** Dietary linoleic acid-induced alterations in pro- and anti-nociceptive lipid autacoids: Implications for idiopathic pain syndromes? *Mol Pain*, 10(12), 1744806916636386.
- Santa-Maria C, López-Enríquez S, Montserrat-de la Paz S, et al. (2023).** Update on Anti-Inflammatory Molecular Mechanisms Induced by Oleic Acid. *Nutrients*, 15(1), 224.
- Santin JR, Kopp MAT, Correa TP, et al. (2023).** Neuroinflammation and hypersensitivity evidenced by the acute and 28-day repeated dose toxicity tests of ostrich oil in mice. *Food Chem Toxicol*, 177, 113852.
- Sendetski M, Wedel S, Furutani K et al. (2024).** Oleic acid released by sensory neurons inhibits TRPV1-mediated pain via FFAR1. *iScience*, 20, 27(8), 110552.
- Sohail R, Mathew M, Patel KK et al. (2023).** Effects of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) and Gastroprotective NSAIDs on the Gastrointestinal Tract: A Narrative Review. *Cureus*, 3;15(4), e37080.
- Sunzini F, Schrepf A, Clauw DJ et al. (2023).** The Biology of Pain: Through the Rheumatology Lens. *Arthritis Rheumatol*, 75, 650-660.
- van der Poll T, van Deventer SJ (1999).** Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect Dis Clin North Am*, 13(2), 413-426.
- Winter CA, Risley EA, Nuss GW. (1962).** Carrageenin-induced edema in hind paw of the rats as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*, 111, 544-547.



The Effect of Second Prostaglandin F2α Application with the Presynchronization Protocol on Fertility in Simmental Cows

Uğur KARA^{1,*} Duygu BAKİ ACAR² Mehmet DÜZER³ Hatice HIZLI⁴

¹ Çukurova University, Faculty of Ceyhan Veterinary Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, 01950, Adana, Türkiye

² Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, 03200, Afyonkarahisar, Türkiye

³ Ballıpınar Farm, 03030, Afyonkarahisar, Türkiye

⁴ Eastern Mediterranean Agricultural Research Institute, 01370, Adana, Türkiye

Received: 20.04.2026

Accepted: 07.07.2026

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the effect of an additional PGF2α injection 24 hours after the first PGF2α in the timed AI Ovsynch protocol on the pregnancy/artificial insemination (P/AI) rate of Simmental cows presynchronized with PG-3-G. The study was conducted on a commercial farm with 103, lactating Simmental cows. Animals were randomly divided into two groups (1) PG-3-G Group (n=56): PGF2α on day 0; GnRH on day 3; Ovsynch initiation after on day 10. (2) PG-3-PG Group (n=47): Second PGF2α addition 24 hours apart before timed AI to PG-3-G protocol. Parity, milk yield, and days in milk (DIM) were compared between the synchronization protocols. The pregnancy rates in the postpartum first and ≥2 TAI were similar between groups (p=0.462 and p=0.566, respectively). There were no statistical differences in the P/AI rates between groups 51.78% (29/56) and 51.06% (27/47), respectively. Multiparous cows revealed numerically higher pregnancy rates than the primiparous cows. However, P/AI results did not differ between groups (p=0.942). The mean preovulatory follicle diameter was 1.71±0.15 cm in the PG-3-G group, and 1.79±0.15 cm in the PG-3-PG group and the difference between groups was significant (p=0.047). In conclusion, administration of a second PGF2α injection to the protocol improved the P/AI numerically in multiparous cows, and preovulatory follicle size. Nevertheless, those findings need to be evaluated by conducting a larger study with a larger sample size.

Keywords: Fertility, GnRH, Presynchronization, Second PGF2α.

ÖZ

Simmental İneklerde Presenkronizasyon Protokolünde İkinci Prostaglandin F2α Uygulamasının Fertilitateye Etkisi

Bu çalışmanın amacı PG-3-G protokolü ile presenkronizasyon protokolü uygulanan Simmental ırkı ineklerde izleyen Ovsynch protokolünde suni tohumlama öncesi uygulanan PGF2α'dan 24 saat sonra ikinci PGF2α enjeksiyonunun gebelik/suni tohumlama (G/ST) oranına etkisinin değerlendirilmesidir. Çalışma ticari bir çiftlikte yetiştirilen 103 adet sağmal Simmental inekte gerçekleştirildi. Hayvanlar rastlantısal olarak iki gruba ayrıldı (1) PG-3-G Grubu(n=56): 0. gün PGF2α; 3. gün GnRH; 10. gün standart Ovsynch protokolü başlangıcı. (2) PG-3-PG Grubu(n=47): PG-3-G grubuna ilave olarak suni tohumlamadan önceki PGF2α'dan 24 saat sonra 2. PGF2α enjeksiyonu. Senkronizasyon grupları arasında parite, süt verimi ve sağılan gün sayısı (SGS) da karşılaştırıldı. Postpartum ilk ve ≥2. ST'da gruplar arası gebelik oranları bakımından fark bulunmadı (p=0.462 and p=0.566, respectively). Gruplar arasında G/ST oranları açısından istatistiksel fark tespit edilmedi, sırasıyla %51.78 (29/56) ve %51.06 (27/47). Multipar ineklerde gebelik oranları primipar ineklere göre daha yüksek olma eğilimi saptandı, ancak gruplar arasında fark önemsizdi (p=0.942). PG-3-G grubunda ortalama preovulatrör folikül çapı 1.71±0.15 cm bulunurken, PG-3-PG grubunda 1.79±0.15 tespit edildi; gruplar arasındaki fark anlamlı bulundu (p=0.047). Sonuç olarak, PG-3-G protokolüne ikinci PGF2α enjeksiyonunun eklenmesinin multipar ineklerde G/ST oranının ve preovulatrör folikül büyüklüğünün artırılmasına katkısı olduğu belirlendi. Bununla birlikte, çalışmada ortaya konan bulguların daha büyük örnek sayısı ile ayrıntılı olarak araştırılması gerektiği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Fertilitate, GnRH, İkinci PGF2α, Presenkronizasyon.



INTRODUCTION

Modern high-yielding dairy cattle farms are confronted with an infertility problem due to the postpartum unfavorable metabolic profiles, hormonal disorders, genital canal infections or poor estrus detection practices (Sakaguchi 2011; Chabanenko et al. 2024). Large herd size, inadequate employees, and inappropriate management factors also lead to poor fertility and decreased pregnancy rates per artificial insemination (P/AI). Thus, various estrous and ovulation synchronization protocols are routinely used in large dairy farms to minimize the poor estrous detection and management (Brusveen et al. 2009; Rethmeier et al. 2019). The Ovsynch protocol is the most widely used protocol, based on GnRH and PGF2 α treatments to improve pregnancy rates by ensuring the correct timing of insemination relative to ovulation, primarily in large herds (Pursley et al. 1997; Stevenson et al. 2012).

Pregnancy rates with the Ovsynch protocol at a random stage of the estrus cycle vary between cows, depending on the ovarian structures on the day of GnRH and PGF2 α treatments. For optimal efficiency of the Ovsynch protocol, the cow should be at the fifth to eighth days of the estrous cycle, with progesterone concentration between 0.5 and 6 ng/mL and a functional dominant follicle of the first follicular wave on the day of the first GnRH injection (G1). The progesterone concentration should also be high (>1 ng/mL) on the day of PGF2 α treatment and low (<0.4 ng/mL) on the day of the second GnRH injection (G2) (Carvalho et al. 2018). Pregnancy rates are low in the anovulatory cows or that do not have a corpus luteum (CL) on the day of G1. Conception success is also low in cows that have poor ovulation or luteinization response to G1 treatment, lack of complete luteolysis after PGF2 α injection, and failure of ovulation of the preovulatory follicle after G2 treatment (Carvalho et al. 2018; Stevenson et al. 2018). Different presynchronization strategies were developed before initiating the Ovsynch protocol to overcome inadequate response and low P/AI rates. Administration of two PGF2 α 14 days apart (Presynch-Ovsynch) or various PGF2 α and GnRH combinations (Double-Ovsynch, G6G, PG-3-G, etc.) before the standard Ovsynch protocol are applied to ensure the early diestrous stage (Borchardt et al. 2017).

Double-Ovsynch (Ovsynch before the timed AI Ovsynch protocol; Souza et al. 2008.) and G-6-G (PGF2 α injection followed by GnRH injection 2 days later, and initiating the Ovsynch protocol in 6 days; Bello et al. 2006.) protocols are effective presynchronization treatments often used in cows. Moreover, the PG-3-G protocol (PGF2 α injection followed by GnRH injection 3 days later, and initiating the Ovsynch protocol in 10 days) is a modification of G-6-G to achieve a greater ovulation response and higher progesterone concentrations in G1, and more functional CL following the Ovsynch protocol (Stevenson et al. 2012). However, both standard Ovsynch and the other presynchronized Ovsynch protocols may result in incomplete luteal regression, and serum progesterone concentrations may be $\geq$ 0.5 ng/mL at timed AI (TAI). Young CL responds inadequately to a single PGF2 α due to the lower luteal oxytocin release and lower affinity to the PGF receptors than adult CL. In addition to this, the number of PGF2 α pulses could be insufficient for the luteal regression of young CL (McCracken et al. 1999; Ginther et al. 2009). Thus, the P/AI results could be poorer than

expected in Ovsynch protocols. To solve incomplete luteolysis, two PGF2 α treatments, 24 hours apart, were applied in Double-Ovsynch and G-6-G protocols before the second GnRH injection of timed AI Ovsynch. It was reported that a distinct luteal regression was obtained following the second PGF2 α injection (Wiltbank et al. 2015; Heidari et al. 2017). In light of this information, the objective of the study was to evaluate the effect of an additional PGF2 α injection 24 hours after the first PGF2 α in the timed AI Ovsynch protocol on the pregnancy/artificial insemination (P/AI) rate of Simmental cows presynchronized with PG-3-G.

MATERIAL AND METHODS

All animal experimental procedures were approved by the Experimental Animal Local Ethics Committee of Afyon Kocatepe University (approval number: 49533702/94).

Animals and Experimental Design

The study was conducted at a commercial farm located in Afyonkarahisar province, Türkiye (38°45'24.00" North latitude and 30°32'23.00" East longitude in the Northern Hemisphere). The study was conducted on 103 lactating Simmental cows (parities 1-8) housed in free-stall barns. Cows were fed a farm-prepared concentrate mixture (crude protein 20%, starch 31.5%, fat 6.4%) consisting of dry hay, dry alfalfa, barley straw silage, and corn silage twice daily (NRC 2001). They had free access to water. Cows were milked twice daily using a 2x12 fishbone milking system. Cows were periodically vaccinated against foot-and-mouth disease, enterotoxemia, mastitis, infectious bovine rhinotracheitis, and bovine viral diarrhea according to the vaccination program. Internal and external parasite treatments were administered twice a year. Animals were monitored during the voluntary waiting period, and the cows with dystocia, placental retention, uterine infections, and other postpartum diseases were not included to the study. All cows were evaluated for body condition score (BCS) on the day of enrollment (one=emaciated, five=obese; Bewley and Schutz, 2008). Animals were randomly divided into two groups. Parity, milk yield ($\leq$ 30 kg/day vs >30 kg/day), and days in milk (DIM; <80 vs $\geq$ 80 days) were compared between the synchronization protocols.

PG-3-G Group (n=56): Cows in this group received PGF2 α (2 ml, I.M.; Cloprostenol, Dalmazin, FATRO, Italy) on day 0; GnRH analogue (2.5 ml, I.M.; 0.004 mg/ml Buserelin acetate, Receptal, Intervet International GmbH, Germany) on day 3; GnRH analogue (2.5 ml, I.M.; 0.004 mg/ml Buserelin acetate, Receptal, Intervet International GmbH, Germany) on day 10; 150 μ g PGF2 α (2 ml, I.M.; Cloprostenol, Dalmazin, FATRO, Italy) was injected into all cows on day 17, and GnRH treatment was administered with the same dose on day 20 (56 hours after PGF2 α). Cows were FTAI 16 hours after the last GnRH administration by the same veterinarian with the frozen-thawed semen of a single bull (Figure 1).

PG-3-PG Group (n=47): Cows in this group received the same treatments as PG-3-G group, except an additional PGF2 α treatment on day 18 and followed the last GnRH injection (32 hours after the additional PGF2 α injection). Cows were FTAI 16 hours after the last GnRH administration by the same veterinarian with the frozen-thawed semen of a single bull (Figure 1).

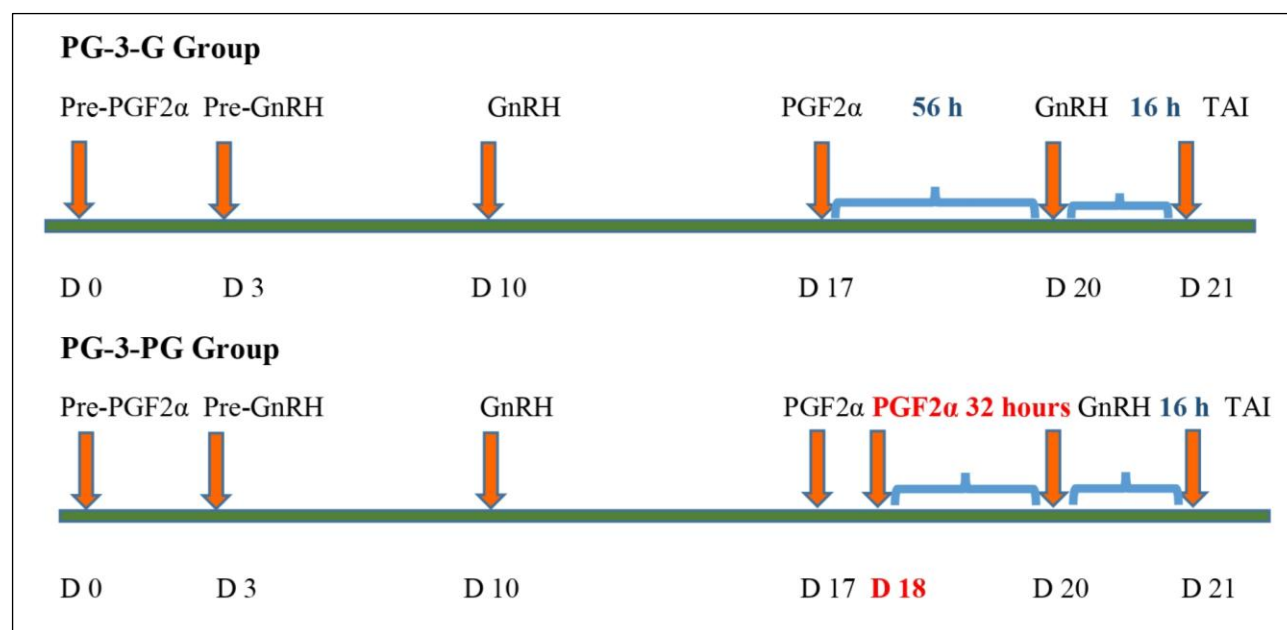


Figure 1: Illustration of the hormonal treatment protocols of PG-3-G and PG-3-PG groups. PGF2 α : Prostaglandin F2 α , GnRH: Gonadotropin-releasing hormone, TAI: Timed artificial insemination, h: Hour, D: Day.

Reproductive tract examinations were performed by ultrasonography (HT838, Hasvet, Türkiye) before protocol initiation. The presence of CL, a dominant follicle (DF), or an ovarian cyst was recorded before hormone treatment. The reproductive tract scores (RTS) at the time of AI were classified considering the size (cervical and uterine) and the position of the genital tract relative to the pelvis before TAI (Young et al. 2017). *The reproductive tract score 1 (RTS1)*: Small and compact uterine horns entirely within the pelvic cavity; *RTS2*: Cervix within the pelvic cavity, but with the longer uterine horns outside the pelvic cavity; *RTS3*: Cervix and larger and rested uterine horns lie outside the pelvic cavity. Pregnancy status was diagnosed by transrectal ultrasonography on day 35 after TAI by confirming a viable embryo with a positive heartbeat.

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) Version 20.0. Descriptive data were presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) for continuous variables and percentages for categorical variables.

Normality of continuous variables was assessed using the Shapiro–Wilk test. Comparisons between synchronization groups for continuous variables, including parity, milk yield, DIM, and preovulatory follicle diameter, were

performed using the independent samples Student's t-test for normally distributed data.

Pregnancy per artificial insemination (P/AI) rates and other categorical reproductive outcomes were analyzed using Pearson's Chi-square test or Fisher's Exact test, as appropriate.

Exact p-values were reported throughout the manuscript, and statistical significance was accepted at $p < 0.05$. Because the study was conducted as a preliminary field trial under commercial farm conditions, an a priori power analysis was not performed before animal enrollment. In addition, post-hoc power evaluation suggested that the relatively limited sample size may have reduced the statistical power to detect small differences between synchronization protocols.

RESULTS

The mean parity of the cows was 3.52 ± 2.08 (between 1-8) in the PG-3-G Group and 2.94 ± 1.54 (between 1-7) in the PG-3-PG Group. The synchronization response in all animals was 100% according to the preovulatory follicle findings in pre-insemination ovarian ultrasonography; 56/56 in the PG-3-G group and 47/47 in the PG-3-PG group. Parity, milk yield, DIM, and previous AI number data are summarized in Table 1.

Table 1: The descriptive data of parity, milk yield, DIM, previous AI number (Mean $\pm$ SD; min-max) of Simmental cows.

Parameters	PG-3-G group (n=56)	PG-3-PG group (n=47)	p value
Parity (number)	3.52 $\pm$ 2.08 (1-8)	2.94 $\pm$ 1.54 (1-7)	p=0.116
Milk yield (kg/d)	30.32 $\pm$ 6.88	30.49 $\pm$ 6.85	p=0.902
DIM (days)	154.07 $\pm$ 120.49	110.91 $\pm$ 68.10	p=0.032
Previous AI number	1.13 $\pm$ 1.54 (0-6)	1.02 $\pm$ 1.93 (0-9)	p=0.762

DIM: days in milk; AI: artificial insemination; SD: Standard deviation. Categorical variables were analyzed using t test.

The pregnancy rates in the postpartum first and ≥ 2 TAI were similar between groups ($p=0.462$ and $p=0.566$, respectively). There were no statistical differences in the P/AI rates between groups 51.78% (29/56) and 51.06% (27/47), respectively (Table 2). Multiparous cows revealed numerically higher pregnancy rates (54.34% in the PG-3-G, and 58.97% in the PG-3-PG groups) than the primiparous cows (40.0%, and 12.5%), respectively.

However, P/AI results did not differ between groups ($p=0.942$). There was no interaction between lactation number, DIM, milk yield, and P/AI for cows in both groups (all $p>0.05$) (Table 2). There was, even if not a statistical difference in pregnancy rates between groups related to milk yield, a clear descriptive difference for higher pregnancy rates in cows >30 kg/day (69.23%) than in cows ≤ 30 kg/day (28.57%) in the PG-3-PG group.

Table 2: The effects of postpartum AI number, parity, lactation number, DIM, and milk yield on P/AI in synchronization groups.

Parameters	PG-3-G group	PG-3-PG group	p value
P/AI (%)	51.78 (29/56)	51.06 (24/47)	$p=0.942$
P/AI at the postpartum first AI (%)	50.0 (15/30)	56.0 (14/25)	$p=0.462$
P/AI ≥ 2 postpartum AI (%)	53.84 (14/26)	45.45 (10/22)	$p=0.566$
Primiparous P/AI (%)	40.0 (4/10)	12.50 (1/8)	$p=0.208$
Multiparous P/AI (%)	54.34 (25/46)	58.97 (23/39)	$p=0.670$
Lactation number ≤ 3 P/AI (%)	50.0 (17/34)	52.77 (19/36)	$p=0.818$
Lactation number >3 P/AI (%)	54.54 (12/22)	45.45 (5/11)	$p=0.628$
Lactation number >2 P/AI (%)	56.25 (18/32)	62.96 (17/27)	$p=0.604$
Lactation number ≤ 2 P/AI (%)	50.0 (12/24)	35.0 (7/20)	$p=0.323$
DIM <100 P/AI (%)	44.82 (13/29)	55.17 (16/29)	$p=0.435$
DIM ≥ 100 P/AI (%)	59.25 (16/27)	44.44 (8/18)	$p=0.335$
Days Open >100 P/AI (%)	50.94 (27/53)	51.06 (24/47)	$p=0.842$
DIM <80 P/AI (%)	45.45 (10/22)	75.0 (12/16)	$p=0.072$
DIM ≥ 80 P/AI (%)	55.88 (19/39)	38.70 (12/31)	$p=0.265$
Milk yield >30 kg/day	50.0 (15/30)	69.23 (18/26)	$p=0.148$
Milk yield ≤ 30 kg/day	53.84 (14/26)	28.57 (6/21)	$p=0.085$

AI: artificial insemination; DIM: days in milk; P/AI: pregnancy per artificial insemination. Categorical variables were analyzed using Pearson's Chi-square test or Fisher's Exact test where appropriate.

The P/AI rates of cows with presence or absence of CL, DF, and ovarian cyst at the initiation of the presynchronization protocols and RTSs at the time of AI were presented in Table 3. The presence of CL or DF at the beginning of the treatments did not affect the P/AI rates ($p>0.05$). There were 9 cows (9/21; P/AI: 42.85%) in the PG-3-G group, and 8 cows (8/12; P/AI: 66.66%) in the PG-3-PG group that had cystic ovarian diseases. Although, there was no

significant difference ($p=0.195$) between groups in related to ovarian cysts, the cows in the PG-3-PG group were tended to have a greater pregnancy rate. The mean preovulatory follicle diameter was 1.71 ± 0.15 cm in the PG-3-G group, and 1.79 ± 0.15 cm in the PG-3-PG group (Table 3). The difference in DF diameter between groups was significant ($p<0.05$), and it was notably greater in the PG-3-PG group.

Table 3: The P/AI rates of cows with presence (+) or absence (-) of corpus luteum (CL), dominant follicle (DF), and ovarian cyst at the initiation of the presynchronization protocols, mean preovulatory follicle diameter and RTSs at the time of AI in synchronization groups.

Parameters	PG-3-G group	PG-3-PG group	p value
CL + P/AI (%)	50.0 (20/40)	46.15 (18/39)	$p=0.734$
CL - P/AI (%)	56.25 (9/16)	62.50 (5/8)	$p=0.774$
DF + P/AI (%)	48.38 (15/31)	43.33 (13/30)	$p=0.695$
DF - P/AI (%)	60.0 (15/25)	64.70 (11/17)	$p=0.761$
Ovarian cyst + P/AI (%)	42.85 (9/21)	66.66 (8/12)	$p=0.195$
Ovarian cyst - P/AI (%)	57.14 (20/35)	45.71 (16/35)	$p=0.195$
Preovulatory follicle diameter (cm)	1.71 ± 0.15	1.79 ± 0.15	$p=0.047$
RTS1 P/AI (%)	59.09 (13/22)	50.0 (14/28)	$p=0.526$
RTS2-3 P/AI (%)	47.05 (16/34)	52.63 (10/19)	$p=0.070$

AI: artificial insemination; CL: corpus luteum; DF: dominant follicle; P/AI: pregnancy per artificial insemination; RTS: reproductive tract score. Categorical variables were analyzed using Pearson's Chi-square test or Fisher's Exact test; preovulatory follicle diameter was analyzed using Student's t-test.

DISCUSSION AND CONCLUSION

The objective of our study was to evaluate the effect of an additional PGF2 α injection 24 hours after the first PGF2 α in the timed AI Ovsynch protocol on the P/AI rate of Simmental cows presynchronized with PG-3-G. We also examined whether influencing factors, such as DIM, parity, milk yield, and ovarian structures at the onset of presynchronization protocols, affected these two protocols. Although there was no significant difference in the P/AI rates between groups, the pregnancy rates were numerically high in the multiparous and higher milk-yielding cows in the PG-3-PG group. In primiparous cows, pregnancy rates were numerically higher in the PG-3-G group than in the other group. The pregnant cow rate that had an ovarian cyst was also proportionately higher in the PG-3-PG group. It was notable that the preovulatory follicle size was significantly greater in the PG-3-PG group.

Pregnancy rates may vary between herds or individuals due to management, environmental, and nutritional factors, health status, BCS, or genital canal diseases. In herds using the standard Ovsynch protocol, fertility success ranges from 40% to 60% (Carvalho et al. 2018; Berean et al. 2025). However, the results reveal that pregnancy rates following hormonal treatments are similar to not applying any hormonal treatments. Different presynchronization strategies are being developed to achieve fertility success rates higher than current results, and they show superior P/AI than the Ovsynch protocol alone (Ambarcioglu et al. 2023). In the last two decades, the PG-3-G protocol has been successfully used as an alternative to Double-Ovsynch and Presynch-Ovsynch treatments (Stevenson et al. 2012; Stevenson 2016). Stevenson et al. (2018) reported that more pregnancies per AI occurred in the PG-3-G treatment (49.2%) than in Ovsynch (32.4%) or Double-Ovsynch (37.4%). Different studies also showed that PG-3-G was superior to Presynch-10 (41.2% vs. 35.0%; Stevenson et al. 2012). The pregnancy rate of the PG-3-G group in the present study (51.78%) was similar to that reported by Stevenson et al. (2018) and higher than that reported by Stevenson et al. (2012). Although many factors affect pregnancy rates across various farm conditions, our P/AI results in the PG-3-G group indicate that P/AI is an effective presynchronization method for improving pregnancy success in dairy cows.

Although presynchronization strategies enhanced the fertility of the Ovsynch protocol, incomplete luteal regression at TAI remains another problem in cows (Heidari et al. 2017). Ovulating in response to the first GnRH injection of Ovsynch increases the risk of incomplete luteal regression following PGF2 α injection because the CL is younger. Studies reported that complete luteal regression fails in 12% to 21% of Ovsynch treatments; serum progesterone concentration is ≥ 0.4 ng/mL at TAI. Consequently, oviduct and uterine motility are negatively affected, gamete transport fails, endometrial thickness decreases, and fertility rates are reduced in these cows (Carvalho et al. 2018; Tippenhauer et al. 2021). Adding a second PGF2 α injection 24 hours apart during the Ovsynch protocol improved the optimization of CL regression in different studies. While Brusveen et al. (2009) reported complete luteal regression in 84.6% of control cows and 95.6% in Ovsynch with additional PGF2 α , Wiltbank et al. (2015) confirmed an increase in CL regression from 83.0% to 97.0%. However, the studies revealed that P/AI rates remained similar to those of the standard Ovsynch protocol, with a numerical difference toward improvement

in multiparous cows. In the present study, while the P/AI rates were similar (51.78% in the PG-3-G group vs. 51.06% in the PG-3-PG group), the pregnancy rates increased insignificantly in the postpartum first AI in the PG-3-PG group (50.0% vs. 56.0%). The previous studies showed that sample size has a critical importance to detect effect size. In a meta-analysis study including 5350 cows, adding a second PGF2 α injection on day 8 to Ovsynch increased P/AI rates by only 4.6% units, but 11.6% units in luteal regression without any statistical difference (Borchardt et al. 2018). Wiltbank et al. (2015) found 4.1% units increase in P/AI in multiparous cows. Our findings suggest a 6.0% units increase in P/AI in the first TAI, and a 4.6% units increase in the multiparous cows with the addition of a second PGF2 α to the PG-3-G protocol. Those findings show that a larger sample size is needed to demonstrate the exact efficiency of the synchronization treatments in herds.

Pregnancy rates revealed numerically higher with additional PGF2 α injections in the present study. However, parity did not significantly affect the P/AI results. We suggest that the small sample size and distribution of primiparous cows led to insufficient findings. Nonetheless, the tendency to increase in multiparous cows is consistent with previous reports (Barletta et al. 2018; Tippenhauer et al. 2021). Interestingly, the P/AI rate in the PG-3-PG group was higher, with milk yield >30 kg/day than ≤ 30 kg/day (69.23% vs 28.57%), although the difference was not significant. The interaction between high milk yield and reproductive efficiency is known as negative due to the risk of negative energy balance in dairy cows. Increased milk production can lead to metabolic and nutritional deficiencies, especially on poorly managed farms (Sakaguchi 2011). In a study conducted in Germany, similar service rate and conception rate were observed in higher milk-yielding (>30 kg) and lower milk-yielding (<30 kg) cows. The authors reported that farm management is more important than milk yield or herd size (Rethmeier et al. 2019). Our results may be associated with good farm management practices, as evidenced by the increased P/AI rates in high-milk-yielding cows, or with the positive effect of a second PGF2 α injection on those animals. However, the exact reason for this data, these findings needs to be further evaluated with a larger sample size.

Preovulatory follicle size is an important factor in conception rates, in accordance with circulating estrogen concentrations. Optimized follicle size and development improve oocyte quality, gamete transport in the oviduct and uterus, and embryonic development in the uterine environment (Wiltbank et al. 2014). In our study, the mean preovulatory follicle diameter was significantly larger in the PG-3-PG group. Heidari et al. (2017) reported that extending the interval between PGF2 α in the presynchronization and GnRH injection of timed Ovsynch affected the largest follicle diameter. Brusveen et al. (2009) also observed a positive effect on ovulatory follicle size during presynchronization of Ovsynch using 14-day-apart PGF2 α administrations. Our preovulatory follicle size results were consistent with previous research. Corpus luteum or dominant follicle presence at the beginning of the presynchronization protocol did not affect the pregnancy rates between groups in the present study. Moreover, P/AI was greater in the PG-3-PG group cows with ovarian cyst. It is suggested that a positive therapeutic effect of additional PGF2 α injection could improve pregnancy success. Having a CL or dominant follicle at the time of initial Ovsynch protocol is consistent with fertility

results in dairy cows. The preferred structure is a dominant follicle of the first follicular wave, which would ovulate after GnRH injection and form a functional CL (Colazo et al. 2017; Carvalho et al. 2018). The ovarian examinations and serum progesterone concentrations at the initiation of the timed AI Ovsynch could not be performed in our study. The lack of a serum progesterone profile was the main limitation of our study. Thus, the interaction between additional PGF2 α during the PG-3-G protocol and the hormonal profile needs to be clarified in further research.

Postpartum uterine diseases, body condition score, and parity affect the uterine score, and there is a relationship with P/AI rates and RTS (Rezende et al. 2020). Cows with larger, lying uterus outside the pelvic cavity had almost 15% lower P/AI rates (Young et al. 2017). Our RTS results were similar across groups, with no differences. The uterine score did not affect the pregnancy rates in the present study.

In conclusion, PG-3-G and PG-3-PG presynchronization protocols are efficient for supporting Ovsynch by increasing pregnancy rates in Simmental cows. Administration of a second PGF2 α injection to the protocol improved the P/AI numerically in multiparous cows, and preovulatory follicle size. Nevertheless, those findings need to be evaluated by conducting a study with a larger sample size.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENT

This study did not receive any funding. The authors express their gratitude to Ballıpinar Farm for his valuable support in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Idea/Concept: UK, DBA
Supervision/Consultancy: UK, DBA, MD, HH
Data Collection and/or Processing: UK, DBA, MD
Analysis and/or Interpretation: HH, UK, DBA
Writing the Article: UK, DBA, HH
Critical Review: UK, DBA

REFERENCES

- Ambarcioğlu P, Mavridis D, Yazlık MO et al. (2023). Comparison of synchronization protocols on pregnancy rate in dairy cows and heifers: A systematic review and network meta-analysis. *J Hellenic Vet Med Soc*, 74(2), 5657-5666.
- Barletta RV, Carvalho PD, Santos VG et al. (2018). Effect of dose and timing of prostaglandin F2 α treatments during a Resynch protocol on luteal regression and fertility to timed artificial insemination in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci*, 101(2), 1730-1736.
- Bello NM, Steibel JP, Pursley JR (2006). Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of Ovsynch in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 89(9), 3413-3424.
- Berean DI, Bogdan LM, Cimpean R (2025). Comparative evaluation of Ovsynch and Double Ovsynch Protocols with single and double insemination in Holstein Dairy Cows: reproductive performance and cost analysis. *Animals*, 15(16), 2380.
- Bewley JM, Schutz MM (2008). An interdisciplinary review of body condition scoring for dairy cattle. *The Professional Animal Scientist*, 24(6), 507-529.

- Borchardt S, Haimerl P, Pohl A, Heuwieser W (2017). Evaluation of prostaglandin F2 α versus prostaglandin F2 α plus gonadotropin-releasing hormone as Presynch methods preceding an Ovsynch in lactating dairy cows: A meta-analysis. *J Dairy Sci*, 100(5), 4065-4077.
- Borchardt S, Pohl A, Carvalho PD, Fricke PM, Heuwieser W (2018). Effect of adding a second prostaglandin F2 α injection during the Ovsynch protocol on luteal regression and fertility in lactating dairy cows: A meta-analysis. *J Dairy Sci*, 101(9), 8566-8571.
- Brusveen DJ, Souza AH, Wiltbank MC (2009). Effects of additional prostaglandin F2 α and estradiol-17 β during Ovsynch in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 92(4), 1412-1422.
- Carvalho PD, Santos VG, Giordano JO et al. (2018). Development of fertility programs to achieve high 21-day pregnancy rates in high-producing dairy cows. *Theriogenology*, 114, 165-172.
- Chabanenko DV, Zhelavskiy MM, Skliarov PM et al. (2024). Postpartum complications in cows: diagnosis, treatment, prevention. *Ukr J Vet Agric Sci*, 7(1), 60-67.
- Colazo MG, Helguera IL, Behrouzi A, Ambrose DJ, Mapletto RJ (2017). Relationship between circulating progesterone at timed-AI and fertility in dairy cows subjected to GnRH-based protocols. *Theriogenology*, 94, 15-20.
- Ginther OJ, Araujo RR, Palhao MP, Rodrigues BL, Beg MA (2009). Necessity of sequential pulses of prostaglandin F2 α for complete physiologic luteolysis in cattle. *Biol Reprod*, 80(4), 641-648.
- Heidari F, Dirandeh E, Pirsaraei ZA, Colazo MG (2017). Modifications of the G6G timed-AI protocol improved pregnancy per AI and reduced pregnancy loss in lactating dairy cows. *Animal*, 11(11), 2002-2009.
- McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC (1999). Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiological Reviews*, 79(2), 263-323.
- NRC (National Research Council) (2001). Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th Revised Edition. National Academy Press, Washington, D.C.
- Pursley JR, Wiltbank MC, Stevenson JS et al. (1997). Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J Dairy Sci*, 80(2), 295-300.
- Rethmeier J, Wenzlau M, Wagner M, Wiedemann S, Bachmann L (2019). Fertility parameters in German dairy herds: associations with milk yield and herd size. *Czech J Anim Sci*, 64, 459-464.
- Rezende EV, Campos CC, Moraes GF, Santos RM (2020). Factors related to uterine score and its influence on pregnancy per artificial insemination in cross bred dairy cows. *Liv Sci*, 241: 104231.
- Sakaguchi M (2011). Practical aspects of the fertility of dairy cattle. *J Reprod Dev*, 57(1), 17-33.
- Souza AH, Ayres H, Ferreira RM, Wiltbank MC (2008). A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 70(2), 208-215.
- Stevenson JS, Pulley SL, Mellieon Jr HI (2012). Prostaglandin F2 α and gonadotropin-releasing hormone administration improve progesterone status, luteal number, and proportion of ovular and anovular dairy cows with corpora lutea before a timed artificial insemination program. *J Dairy Sci*, 95(4), 1831-1844.
- Stevenson JS (2016). Synchronization and artificial insemination strategies in dairy herds. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 32, 349-364.
- Stevenson JS, Sauls JA, Mendonça LGD, Voelz BE (2018). Dose frequency of prostaglandin F2 α administration to dairy cows exposed to presynchronization and either 5-or 7-day Ovsynch program durations: Ovulatory and luteolytic risks. *J Dairy Sci*, 101(10), 9575-9590.
- Tippenhauer CM, Steinmetz I, Heuwieser W et al. (2021). Effect of dose and timing of prostaglandin F2 α treatments during a 7-d Ovsynch protocol on progesterone concentration at the end of the protocol and pregnancy outcomes in lactating Holstein cows. *Theriogenology*, 162, 49-58.
- Young CD, Schrick FN, Pohler KG et al. (2017). A reproductive tract scoring system to manage fertility in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 100(7), 5922-5927.
- Wiltbank MC, Baez GM, Vasconcelos JLM (2014). The physiology and impact on fertility of the period of proestrus in lactating dairy cows. *Anim Reprod*, 11, 225-236.
- Wiltbank MC, Baez GM, Cochrane F et al. (2015). Effect of a second treatment with prostaglandin F2 α during the Ovsynch protocol on luteolysis and pregnancy in dairy cows. *J Dairy Sci*, 98(12), 8644-8654.



Konya İli Kadınhanı ve Sarayönü İlçelerinde Seçilmiş Bazı Hayvan Hastalıklarının Ekonomik Önemi Üzerine Araştırma

Hasan Hüseyin ÖZDEMİR¹ Aytekin GÜNLÜ² *

¹ Kadınhanı İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü, 42800, Konya, Türkiye

² Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Sağlığı Ekonomisi ve İşletmeciliği Anabilim Dalı, 42130, Konya, Türkiye

Geliş Tarihi: 22.04.2026

Kabul Tarihi: 23.06.2026

ÖZ

Bu çalışmada, Konya iline bağlı Kadınhanı ve Sarayönü ilçelerindeki süt sığırcılığı işletmelerinde seçilmiş bazı endemik ve epidemik hayvan hastalıklarının neden olduğu ekonomik kayıplar araştırılmıştır. Araştırma verileri; Kadınhanı'ndan 35 ve Sarayönü'nden 20 olmak üzere toplam 55 işletme sahibiyle yapılan anketler ve Delphi yöntemiyle hazırlanan uzman veteriner hekim anketlerinden elde edilmiştir. Araştırma kapsamında en yüksek hastalık insidansı %32.29 ile ayak hastalıklarında saptanmış; bunu sırasıyla metabolizma (%25.45), meme (%23.13), fertilité (%15.64) ve sindirim sistemi (%3.49) hastalıkları takip etmiştir. Endemik hastalıklarda vaka başına en yüksek kayıp metritis (3.920 TL), en düşük kayıp ise ayak hastalıklarından (2.010 TL) kaynaklanmıştır. İncelenen 55 işletmede saptanan toplam 601 endemik vakada, erken elden çıkarma kaynaklı mali kayıp 10.509.000 TL olarak hesaplanırken; şap, brucella ve tüberküloz gibi epidemik hastalıkların neden olduğu toplam zarar 2.014.714 TL olarak belirlenmiştir. Sonuçlar, hastalık yönetimi ve koruyucu hekimlik eğitimlerinin işletme kârlılığı için kritik öneme sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Ekonomik kayıp, Endemik, Epidemik, İnsidans, Süt sığırcılığı.

ABSTRACT

Research on the Economic Importance of Selected Animal Diseases in Kadınhanı and Sarayönü Districts of Konya Province

This study investigated the structural characteristics of dairy cattle farms in the Kadınhanı and Sarayönü districts of Konya, the economic losses caused by selected endemic and epidemic diseases. Data were collected through surveys conducted with 55 farm owners (35 in Kadınhanı, 20 in Sarayönü) and expert veterinarian questionnaires using the Delphi method. The highest disease incidence was foot diseases (32.29%), followed by metabolic diseases (25.45%), udder diseases (23.13%), fertility problems (15.64%), and digestive system diseases (3.49%). Among endemic diseases, the highest economic loss per case was recorded for metritis (3.920 TRY), while the lowest was for foot diseases (2.010 TRY). In the 55 farms examined, 601 endemic cases resulted in a total loss of 10.509.000 TRY due to early culling. Furthermore, the total loss caused by epidemic diseases such as foot-and-mouth disease, brucellosis, and tuberculosis was determined as 2.014.714 TRY. The results indicate that disease management and preventive medicine training are vital for farm profitability.

Keywords: Dairy cattle, Economic loss, Endemic, Epidemic, Incidence.

GİRİŞ

Hayvancılık sektörü, geleneksel ekonomik, sosyal ve biyolojik fonksiyonlarının yanı sıra; günümüzde artan sera gazı emisyonları, küresel ısınma ve iklim değişikliği gibi küresel ölçekli çevresel sorunlar nedeniyle stratejik bir konuma gelmiştir (FAO 2019). Bilinçsiz tüketim alışkanlıkları, gıda israfı ve gelişmekte olan ülkelerdeki gıda güvenliği sorunları, hayvansal üretim süreçlerinde girdi kullanımının rasyonelleştirilmesini daha da zorunlu kılmaktadır. Bu bağlamda hayvan hastalıkları; üretim verimliliği ve girdi optimizasyonunun yanı sıra ürün kalitesi, fiyat istikrarı ve tüketici refahını doğrudan

etkileyen kritik bir parametredir (Günlü 2020a). Özellikle entansif ve yüksek kapasiteli üretim modellerinde yatırım maliyetlerinin artması, kaynak kullanımında etkinliği (prodüktivite) temel öncelik haline getirmiştir. Hayvan hastalıkları, bir taraftan işletme maliyetlerinde artışa yol açarken, diğer taraftan nihai ürün kayıpları ve pazar fiyatlarındaki yükselişlerin temel nedenini de oluşturmaktadır (Kappes ve ark. 2023). Özellikle endemik ve epidemik karakterdeki hastalıklar, uluslararası hayvan ve hayvansal ürün ticaretinde olası birtakım kısıtlamalar ve engellemeler nedeniyle pazarlama faaliyetleri önünde önemli bir engel teşkil etmektedir. Sıralanan tüm bu



nedenlerle, kârlı ve verimli bir hayvansal üretimin sağlanabilmesi için hayvan hastalıklarının işletme ekonomisi prensipleri ve bilimsel yöntemler çerçevesinde analiz edilmesi; mücadele programları ile planlamaların bu analizlere dayalı olarak hazırlanması gerekmektedir (Akın 2023).

Hayvan hastalıklarının yol açtığı ekonomik kayıplar; uygulanan eradikasyon programının başarısı ya da başarı oranı, hastalığın zoonoz olması ve uluslararası ticaret kısıtlamalarına konu olup olmaması gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Günlü 2020a). Hayvan hastalıklarının üretim maliyetleri üzerindeki etkisini analiz edebilmek için öncelikle hastalığın epidemiyolojik karakterinin (endemik, epidemik) bilinmesi ve doğru tanımlanması gerekmektedir. Belirli kontrol programları ile eradike edilebilen hastalıklar tamamen denetim altına alınabilirken; öngörülemeyen ve işletmeden işletmeye farklılık gösteren endemik hastalıklar, işletmelerin sürdürülebilirliğini tehdit eden, rasyonel olarak mücadele edilmesini gerektiren önemli bir unsur haline almıştır (Yalçın 2000).

Hayvan hastalıkları ve bu hastalıkların neden olduğu salgınlar halk sağlığı, çevre ve hayvanın refahı üzerinde de önemli bir tehdittir (Sipahi 2023). Hayvan hastalıkları tüm dünyada başta azalan üretkenlik ve hastalıkların artan kontrol maliyetleri ile ortaya çıkan ticari kayıplara ve salgının boyutuna bağlı olarak uluslararası düzeyde gıda güvensizliğine de yol açabilmektedir (Dehove ve ark. 2012).

Literatür incelendiğinde, hayvansal üretimde ekonomik kayıplara yol açan endemik hastalıklar arasında; fertilitite problemlerinin %3-%15.2, meme hastalıklarının %5-%44.0, jinekolojik sorunların %3.0-%25.0, ayak hastalıklarının %0.3-%30 ve metabolik hastalıkların %1-%12 aralığında insidans gösterdiği bildirilmiştir (Yalçın ve ark. 2006). Yapılan çalışmalarda süt sığırcılığı işletmelerinde sürüden çıkarma nedenlerinin başında %17.9 ile kısırlık ve %16.2 ile meme hastalıklarının geldiği bildirilmiştir (Yaylak 2003). ABD'de yapılan bir çalışmada, seçilmiş bazı endemik hastalıkların hayvan başına maliyetinin ortalama 172.4 US\$ olduğu; bu maliyetin %13'ünü fertilitite, %5'ini pnömoni, %5'ini ayak hastalıkları ve güç doğum, %4'ünü ise hipokalsemi ve abomazum deplasmanının oluşturduğu kaydedilmiştir (Miller ve Dorn 1990). Türkiye özelinde ise hayvansal üretimin en önemli kayıp kalemlerinden biri olan buzağı ölümlerinin yıllık 800.000 ile 1.000.000 baş arasında olduğu ve bu durumun ülke ekonomisine yıllık 2-2.5 milyar TL düzeyinde bir mali yük getirdiği tahmin edilmektedir (Günlü 2020b).

Şap hastalığı da makro ve mikro düzeyde ciddi ekonomik kayıplara neden olan bir diğer unsurdur. Türkiye ekonomisine etkisi üzerine yapılan bir çalışmada, 1983 yılı verileriyle şap hastalığının süt üretiminde 8 milyon US\$, et üretiminde ise 81 milyon US\$ kayba neden olduğu hesaplanmıştır (Ertan 2015). Benzer şekilde, 2001 yılında İngiltere'de görülen şap salgınının tarım sektöründe 3.1 milyar £, turizm sektöründe ise yaklaşık 3 milyar £ gelir kaybına yol açtığı bildirilmiştir (Thompson ve ark. 2002). Diğer zoonoz ve salgın hastalıklardan şarbonun Türkiye'deki maliyeti 2016-2018 yılları arasında artış göstererek 2018'de 4.2 milyon TL seviyesine ulaşmıştır (Arı ve ark. 2020). Brucella hastalığının ise 2016 yılında 12.9 milyon TL olan mali yükünün, 2018 yılında 72.8 milyon TL'ye yükseldiği görülmektedir. Özellikle büyükbaş hayvancılıkta Brucella kaynaklı kayıpların önemli bir kısmını "doğmamış buzağı" kayıpları oluşturmaktadır. Bu

kalemin maliyeti 2016 yılında 5 milyon TL iken 2018 yılında 21.6 milyon TL'ye ulaşmıştır (Arı ve ark. 2020).

Bu çalışma; Konya ili Kadınhanı ve Sarayönü ilçelerinde süt sığırcılığı yapan işletmelerin, seçilmiş endemik ve epidemik hastalıklarla karşılaşma durumlarını saptamak, bu hastalıkların neden olduğu ekonomik kayıpları belirlemek ve söz konusu kayıpların güncel maliyet analizlerini ortaya koymak amacıyla gerçekleştirilmiştir.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışma için, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu'ndan (Tarih: 31.08.2023, Karar Sayısı: 2023/103) projenin araştırma etiği açısından uygun olduğuna dair belge alınmıştır.

Araştırma Alanı ve Veri Kaynakları

Bu araştırmanın materyalini, 2023-2024 üretim döneminde Konya ili Kadınhanı ve Sarayönü ilçelerinde süt sığırcılığı faaliyetinde bulunan ve tesadüfi (rastgele) yöntemle seçilen 55 adet işletmeden anket yoluyla elde edilen veriler oluşturmaktadır. Çalışmada, bölgede yaygın görülen belirli endemik ve epidemik hastalıkların görülme sıklığı ile bu hastalıkların neden olduğu ekonomik kayıpların saptanması hedeflenmiştir. Hastalık insidanslarının hesaplanmasında Yalçın ve ark. (2008) bildirdiği yöntem esas alınmıştır. Hayvan sağlığı ve hastalıklar nedeniyle ortaya çıkan ekonomik kayıpların ve hastalığın toplam ekonomik yükünün ve dışsal kayıpların tahmininde ihtiyaç duyulan verilerin yetersizliği önemli bir sorun teşkil etmektedir (Schrobbach ve ark. 2023). Dünyanın birçok ülkesinde olduğu gibi ülkemizde de bu veriler yetersizdir. Verilerin sınırlı ya da eksik olduğu durumlarda, kayıp ve maliyet verilerinin elde edilmesinde alternatif yöntemlere başvurulmaktadır. Bu amaçla, hastalık kaynaklı ekonomik kayıpların doğru bir şekilde projekte edilebilmesi amacıyla, bölgede uzun yıllar görev yapmış kamu veteriner hekimleri ve klinisyenlerden oluşan bir uzman grubu ile görüşülmüştür. Bu aşamada, Can (2009) tarafından bildirilen yöntem uygun olarak Delphi Anket Tekniği kullanılmıştır. Uzman seçiminde; mesleki deneyim, bölge hayvancılığına hâkimiyet ve veri paylaşımına gönüllülük esas alınmış ve bu amaçlara uyumlu 8 uzman hekim ile veri temin formları uygulanmıştır.

Örnekleme Yöntemi ve Hacmi

Araştırma bölgesindeki işletme popülasyonunu temsil edecek minimum örneklem hacmi aşağıda belirtilen formül çerçevesinde hesaplanmıştır (Israel 2009; Scheaffer ve ark. 2011).

$$n_0 = \frac{Z^2 \times p \times (1 - p)}{d^2}$$

Başlangıçta planlanan tabakalı örnekleme yöntemi, büyük kapasiteli işletme sahiplerinin veri paylaşımı konusundaki çekinceleri ve sahadaki ulaşılabilirlik kısıtları nedeniyle yenilenmiştir. Yapılan pilot çalışma ve uzman öngörülere neticesinde, %90 güven düzeyi ve %10 hata payı ile temsil gücü yüksek olan 55 işletme üzerinden çalışma yürütülmüştür (Z=1.645; p=0.70; e=0.10; N=2636).

Ekonomik Kayıp Hesaplamaları

Elde edilen verilerden yola çıkarak hayvan hastalıklarının ekonomik kayıpları hesaplanmıştır. Bu amaçla hazırlanan anket formlarında hastalıklardan kaynaklanan kayıp kalemleri; verim kayıpları, zorunlu elden çıkarma veya itlaf maliyetleri, sürü yenileme maliyetleri, tedavi

harcamaları ve artan işgücü giderleri olarak düzenlenmiştir. Kayıp kalemlerinin belirlenmesinde Yalçın ve ark. (2008)'in bildirdiği yöntemler esas alınmış ve uzman anketlerine dayalı olarak hastalıklar nedeniyle oluşan finansal kayıplar ortaya konulmuştur. Tüm parasal değerler Türk lirası (TL) cinsinden sunulmuş ve bu değerlerde binlik ayırıcı olarak nokta kullanılmıştır.

İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen veriler betimsel istatistikler kullanılarak değerlendirilmiştir. İşletmelere ait kategorik değişkenler frekans ve yüzde değerleriyle sunulmuştur. Hastalık gruplarının görülme sıklıkları, ilgili hastalık grubuna ait vaka sayısının toplam vaka sayısına oranlanmasıyla hesaplanmıştır. Hastalık alt gruplarına ilişkin yüzdelere ise her bir hastalık grubunun kendi içindeki dağılımını göstermektedir. Çalışmanın amacı seçilmiş hastalıklara bağlı ekonomik kayıpları tanımlayıcı düzeyde ortaya koymak olduğundan, hastalık grupları veya ilçeler arasında istatistik karşılaştırmalar yapılmamıştır. Hesaplamalar Microsoft Excel ortamında gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR

İşletmelerin Hayvan Varlığına İlişkin Bulgular

Araştırma kapsamında incelenen işletmelerin hayvan varlıklarına ait dağılım bilgileri Tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1: Seçilen hayvancılık işletmelerinin hayvan varlıklarına göre dağılımı.

Table 1: Distribution of the selected livestock enterprises according to their animal assets.

İşletme Hayvan Varlıkları	Frekans (n)	Oran (%)
30 ve altı	35	63.7
30 ile 50 arası	8	14.5
51 ve üzeri	12	21.8
Toplam	55	100.0

Tablo 1 incelendiğinde; işletmelerin %63.7'sinin 30 ve daha az, %14.5'inin 31-50 baş arası ve %21.8'inin ise 51 baş ve üzeri hayvan varlığına sahip olduğu görülmektedir.

Hayvan Kayıplarının Yaş Gruplarına Göre Dağılımı ve Ekonomik Değerleri

Kadınhanı ve Sarayönü ilçelerinde süt sığırcılığı yapan işletmelerde, son bir yıl içinde gerçekleşen hayvan kayıplarının yaş aralıkları ve bu kayıpların mali değerleri Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2: İşletmelerde son bir yıl içinde görülen hayvan kayıplarının yaş aralıkları ve ekonomik karşılıkları.

Table 2: Age ranges and economic equivalents of animal losses observed in the enterprises within the last year.

Hayvan Yaş Aralığı	İşletmede Ölen Hayvanlar		Kayıp Değeri (TL)
	Frekans (f)	Oran (%)	
0 - 6 Ay	176	65.42	3.949.000
6 - 12 Ay	9	3.36	380.000
≥ 12 Ay	84	31.22	6.180.000
Toplam	269	100	10.509.000

(2023 Döviz kuru ortalama 1 US\$ = 25 TL baz alınmıştır).

İncelenen dönemde toplam kayıpların %65.42 gibi büyük bir oranının 0-6 aylık yaş grubunda (buzağı/genç hayvan) gerçekleştiği; %31.22'lik kısmın ise 12 ay ve üzeri yaş grubundaki hayvanlardan oluştuğu tespit edilmiştir. Söz konusu ölümlerin nedenleri incelendiğinde; %93.30 ile hastalıklar ilk sırada yer alırken, bunu %4.84 ile travmalar ve %1.86 ile doğal afetler izlemektedir. Özellikle 0-6 aylık gruptaki kayıpların temel nedeninin ishal ve ishale bağlı şekillenen sepsisemi olduğu gözlenmiştir.

Tablo 3'te Kadınhanı ve Sarayönü ilçelerinde süt sığırcılığı yapan işletmelerde belirlenen bazı endemik hastalıkların görülme sıklıkları sunulmuştur.

Tablo 3: Kadınhanı ve Sarayönü'ndeki süt sığırcılığı işletmelerinde görülen seçilmiş bazı endemik hastalıkların insidans ve dağılımı.

Table 3: Incidence and distribution of selected endemic diseases observed in dairy cattle enterprises in Kadınhanı and Sarayönü.

Hastalık Grubu ve Alt Türleri	Frekans (n)	Oran (%)
Metabolizma Hastalıkları	153	25.45
-- Hipokalsemi	51	33.34*
-- Asidoz	19	12.42*
-- Karaciğer Hastalıkları	83	54.24*
Fertilite Problemleri	94	15.64
-- Ovaryum Kisti	59	62.77*
-- Metritis	22	23.41*
-- Retensiyon Sekundinarum	13	13.82*
Meme Problemleri	139	23.13
-- Mastitis	113	81.29*
-- Memenin Yapısal Problemleri	24	17.26*
-- Meme Ödemi	2	1.45*
Ayak Hastalıkları	194	32.29
-- Tırnak Problemleri	141	72.68*
-- Taban Çürüğü	31	15.97*
-- İnterdigital Dermatit	22	11.35*
Sindirim Sistemi Hastalıkları	21	3.49
TOPLAM	601	100

*İlgili hastalık grubunun kendi içindeki yüzdesini ifade eder.

İşletmelerde görülme sıklığı bakımından en fazla karşılaşılan sağlık problemini %32.29 ile ayak hastalıkları oluştururken; bunu sırasıyla %25.45 ile metabolizma hastalıkları ve %23.13 ile meme hastalıkları takip etmektedir. Fertilite problemlerinin dağılımı incelendiğinde; vakaların %62.77'sini ovaryum kistlerinin oluşturduğu, bunu %23.41 ile metritis ve %13.82 ile retensiyon sekundinarum vakalarının izlediği görülmektedir.

Çalışma kapsamında incelenen bazı endemik hastalıkların klinik seyrine göre hesaplanan ekonomik kayıplar Tablo 4 ve Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 4'te görüldüğü üzere, hipokalsemi kaynaklı toplam ekonomik kayıplar hastalığın hafif, şiddetli ve ölümcül formlarına göre değişkenlik göstermektedir. Toplam maliyet; hafif vakalarda hayvan başına ortalama olarak 2.450 TL, şiddetli vakalarda 3.820 TL ve ölümcül seyreden vakalarda 44.900 TL olarak hesaplanmıştır. Tedavinin

başarılı olduğu varsayılan vakalar üzerinden yapılan hesaplamada ortalama kaybın 3.723 TL/Baş olduğu belirlenmiştir. Hastalığın şiddetli formunda en önemli maliyet kalemini tedavi masrafları oluşturmakta olup, bu giderlerin toplam kaybın yaklaşık %68.5'ini (2.620 TL/Baş) kapsadığı görülmektedir.

Tablo 4: Hipokalsemi kaynaklı ekonomik kayıplar (TL/Baş).

Table 4: Economic losses caused by hypocalcemia (TL/Head).

Maliyet Kalemleri	Hafif	Şiddetli	Ölümçül
Süt Verim Kaybı	720	1.200	1.200
Sürüden Çıkarma / İtlaf Maliyeti	-	-	40.000
Tedavi Masrafları (İlaç + İşçilik + Vet.)	1.730	2.620	3.700
-- İlaç Masrafları	1.040	1.750	2.250
-- Veteriner Hekim Ücreti	600	600	1.000
-- Artan İşçilik Giderleri	90	270	450
Toplam Hastalık Maliyeti	2.450	3.820	44.900
Görülme Sıklığı (%)*	%26	%56	%10

(2023 Yılı TİGEM düve satış fiyatı ortalama 93.000 TL; 1 US\$ = 25 TL baz alınmıştır).

*Hastalık seyri oranları uzman görüşlerine dayanmaktadır. Hafif, şiddetli ve ölümçül kategorileri toplam dağılımın %92'sini oluşturmuş; kalan %8'lik bölüm, klinik belirtileri hafif seyreden, veteriner hekime ulaştırılmayan ve yetiştirici tarafından kendi imkânlarıyla müdahale edilen hafif nitelikli bildirimlerden kaynaklanmıştır.

Tablo 5: Mastitis vakalarından kaynaklanan ekonomik kayıplar (TL/Baş).

Table 5: Economic losses resulting from mastitis cases (TL/Head).

Maliyet Kalemleri	Hafif	Şiddetli	Ölümçül
Süt Verim Kaybı	1.300	2.275	2.600
Sürüden Çıkarma/ İtlaf Maliyeti	-	-	40.000
Tedavi Masrafları	1.250	2.590	3.810
-- İlaç Masrafları	1.070	1.675	2.450
-- Veteriner Hekim Ücreti	-	600	1.000
-- Artan İşçilik Giderleri	180	315	360
Toplam Hastalık Maliyeti	2.550	4.865	46.410
Görülme Sıklığı (%)*	%26	%56	%10

(2023 Döviz kuru ortalama 1 US\$ = 25 TL baz alınmıştır).

*Hastalık seyri oranları uzman görüşlerine dayanmaktadır. Hafif, şiddetli ve ölümçül kategorileri toplam dağılımın %92'sini oluşturmuş; kalan %8'lik bölüm veteriner hekime ulaştırılmayan ve yetiştirici tarafından kendi imkânlarıyla müdahale edilen hafif nitelikli bildirimlerden kaynaklanmıştır.

Tablo 5 verilerine göre; mastitis vakalarının işletme maliyeti, hastalığın seyrine bağlı olarak vaka başına ortalama olarak 2.550 TL ile 46.410 TL arasında değişmektedir. Çalışma bulguları literatürde bildirilen laktasyondaki hayvan başına ortalama 240 €/inek/yıl (van Soest ve ark. 2016) değerinden daha düşüktür. Hafif mastitis vakalarında yetiştiricilerin %90'ının veteriner hekim yardımı almadan kendi imkânlarıyla tedaviye

yöneldiği, bu nedenle bu vakalardaki temel kayıp kaleminin ilaç giderlerinden oluştuğu saptanmıştır. Hastalık seyri ağırlaşıkça veteriner hekime başvuru oranının arttığı; bu oranın şiddetli vakalarda %55, ölümçül vakalarda ise %85 düzeyinde olduğu belirlenmiştir. Saha anketlerinden elde edilen verilere göre, hafif vakaların %48'i tek meme lobunda (quarter) sınırlı kalırken, şiddetli ve ölümçül vakalarda hastalığın iki veya daha fazla loba yayıldığı saptanmıştır. Ayrıca, tedaviye yanıt vermeme oranının hafif vakalarda %18 iken, şiddetli vakalarda %59'a kadar yükseldiği tespit edilmiştir.

Tablo 6 klinik metritis vakalarının seyrine göre neden olduğu ekonomik kayıpları ve hastalığın genel karakteristiklerini özetlemektedir.

Tablo 6: Klinik metritis vakalarında hastalığın seyri ve neden olduğu ekonomik kayıplar (TL/Baş).

Table 6: Disease progression and economic losses caused by clinical metritis cases (TL/Head).

Maliyet Kalemleri	Hafif	Şiddetli
Süt Verim Kaybı	1.300	2.080
Tedavi Masrafları (İlaç + İşçilik + Vet.)	1.725	2.760
-- İlaç Masrafları	900	1.800
-- Veteriner Hekim Ücreti	600	600
-- Artan İşçilik Giderleri	225	360
Toplam Hastalık Maliyeti	3.025	4.840
Görülme Sıklığı (%)*	%60	%30
Tedaviden Sonra Nüks Etme (%)	%15	%20
Veteriner Hekim Müdahale Oranı (%)	%10	%50

(2023 Yılı TİGEM fiyatları; 1 US\$ = 25 TL baz alınmıştır).

*Görülme sıklığı oranları uzman görüşlerine dayanmaktadır. Hafif ve şiddetli klinik metritis vakaları toplam dağılımın %90'ını oluşturmuş; kalan %10'luk bölüm, veteriner hekime ulaştırılmayan ve yetiştirici tarafından kendi imkânlarıyla müdahale edilen hafif nitelikli bildirimlerden kaynaklanmıştır.

Tablo 6 incelendiğinde; klinik metritis vakalarının seyrine bağlı olarak vaka başına maliyetin hafif vakalarda ortalama olarak 3.025 TL, şiddetli vakalarda ise 4.840 TL olduğu görülmektedir. Hafif seyreden vakalarda ilaç masrafları, toplam tedavi giderinin %52'sini, toplam ekonomik kaybın ise %30'unu oluştururken; şiddetli vakalarda ilaç masraflarının payı tedavi giderleri içinde %65'e, toplam kayıp içinde ise %37'ye yükselmektedir. Saha araştırmalarına göre, metritis vakalarının %60'ı hafif semptomlarla seyrederken, şiddetli vakaların önemli bir kısmının kronikleşme eğilimi gösterdiği ve yetiştiricilerin zorunlu elden çıkarma (itlaf/satış) riskiyle karşı karşıya kaldığı saptanmıştır.

Tablo 7'de görüldüğü üzere; ayak hastalıkları alt grubunda yer alan interdigital dermatit, tırnak problemleri ve taban çürüğü vakalarının neden olduğu birim maliyetler sırasıyla hayvan başına ortalama olarak 2.200 TL, 2.010 TL ve 3.770 TL'dir. Hastalıkların görülme sıklıklarına dikkate alınarak yapılan ağırlıklı ortalama hesabına göre, ayak hastalıklarının işletme başına ortalama maliyeti vaka başına 2.660 TL olarak hesaplanmıştır.

Hangi formda olursa olsun, ayak hastalıklarında toplam maliyet içerisindeki en büyük payı tedavi masrafları

oluşturmakta, bu giderlerin yaklaşık %50'sini ise ilaç harcamaları kapsamaktadır. Anket çalışmasına katılan işletmelerde ayak rahatsızlıkları en yüksek oranda (%55) tırnak problemleri şeklinde görülürken, bunu %40 ile taban çürüğü izlemektedir. Özellikle nüks (tekrarlama) oranlarının tüm formlarda %50'nin üzerinde olması, ayak hastalıklarının kronikleşen bir maliyet yükü oluşturduğunu göstermektedir.

Tablo 7: Ayak hastalıklarının türlerine göre ekonomik kayıpları ve insidansları (TL/Baş).

Table 7: Economic losses and incidence rates of hoof diseases according to their types (TL/Head).

Maliyet Kalemleri	İnterdigital Dermatit	Tırnak Problemleri	Taban Çürüğü
Süt Verim Kaybı	390	390	780
Tedavi Masrafları	1.830	1.620	2.990
-- İlaç Masrafları	1.010	750	1.700
-- Veteriner Hekim Ücreti	550	600	750
-- Artan İşçilik Giderleri	270	270	540
Toplam Hastalık Maliyeti	2.200	2.010	3.770
Görülme Sıklığı (%)*	%20	%55	%40
Tedaviden Sonra Nüks Etme (%)	%56	%60	%60
Veteriner Hekim Müdahale Oranı (%)	%23	%30	%60

(2023 Döviz kuru ortalama 1 US\$ = 25 TL baz alınmıştır).

*Ayak hastalıkları alt türlerine ilişkin oranlar uzman görüşlerine dayanmaktadır. Aynı hayvanda birden fazla ayak problemi birlikte görülebildiğinden, alt türlere ait oranların toplamı %100'ü aşabilmektedir.

Seçilen Bazı Zoonoz Hastalıkların İşletmelerde Görülme Sıklıkları ve Neden Oldukları Ekonomik Kayıplar

Tablo 8'de, Konya ili Kadınhanı ve Sarayönü ilçelerinde süt sığırcılığı yapan işletmelerde en sık karşılaşılan ve ihbarı mecburi olan bazı zoonoz hastalıkların görülme sıklıkları ile bu hastalıkların neden olduğu ekonomik kayıplar sunulmuştur. Bu veriler, Tarım ve Orman Bakanlığı kayıtları ile saha anketleri neticesinde elde edilen sonuçların sentezlenmesiyle oluşturulmuştur.

Araştırma kapsamındaki 55 hayvancılık işletmesi incelendiğinde; işletmelerin %78.18'inde şap, %90.91'inde brucella ve %96.36'sında tüberküloz hastalığına rastlanmadığı, antraks vakasına ise hiçbir işletmede (%100) rastlanmadığı belirlenmiştir.

Zoonoz hastalıklar arasında ekonomik olarak en yüksek toplam kayıp, 900.000 TL ile tüberküloz vakalarında görülmüştür. Bu durumun temel sebebi, tüberküloz tanısı konulan tüm hayvanların (27 baş) doğrudan zorunlu kesime/itlafa sevk edilmesidir. Şap hastalığı ise hem etkilenen hayvan sayısının fazlalığı hem de yasal olarak tedaviye izin verilen tek zoonoz hastalık olması nedeniyle 190.490 TL'lik tedavi maliyetiyle dikkat çekmektedir. Brucella vakalarında ise koruma ve kontrol harcamaları ile zorunlu elden çıkarma kalemleri toplamda 408.204 TL'lik bir kayıp oluşturmuştur.

Ekonomik kayıplar hesaplanırken, yetiştiricinin mağduriyetini azaltan devlet tazminatları ve kesim bedelleri toplam zarardan düşüldüğü için, sunulan rakamlar işletmenin doğrudan üstlendiği "net kaybı" yansıtmaktadır.

Tablo 8: Zoonoz hastalıkların insidansları ve neden oldukları ekonomik kayıplar.

Table 8: Incidence rates of zoonotic diseases and the economic losses they cause.

Kayıp Kalemleri	ŞAP	BRUCELLA	TÜBERKÜLOZ	ANTRAKS
Hastalığın Görülmediği İşletme Sayısı (n)	43	50	53	55
Hastalığın Görülmediği İşletme Oranı (%)	78.18	90.91	96.36	100.00
Hastalıktan Etkilenen İşletme Sayısı (n)	12	5	2	0
Hastalıktan Etkilenen İşletme Oranı (%)	21.82	9.09	3.64	0.00
Hastalıktan Etkilenen Hayvan Sayısı (n)	86	16	27	0
Ölen veya Kesilen Hayvan Sayısı (n)	32	16	27	0
Tedavi Giderleri (TL) *	190.490	0	0	0
Koruma ve Kontrol Harcamaları (TL) **	66.020	13.204	0	0
Zorunlu Elden Çıkarma Kaybı (TL) ***	450.000	395.000	900.000	0
TOPLAM KAYIP (TL)	706.510	408.204	900.000	0

(2023 Döviz kuru ortalama 1 US\$ = 25 TL baz alınmıştır). * Şap dışındaki zoonoz hastalıklarda yasal mevzuat gereği tedaviye izin verilmemektedir. ** Koruma ve kontrol uygulamaları Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından yürütülmektedir. *** Kayıp miktarları; şarta tabi kesim bedeli ve Bakanlıkça ödenen tazminatlar düşülerek hesaplanmıştır.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Türkiye'de hayvan hastalıklarının ekonomik kayıplarına yönelik saha çalışmaları ağırlıklı olarak anket çalışmaları ve Delphi uzman görüşleri yöntemine dayanmaktadır (Yıldız ve Yalçın 2014). Literatürde önemli kayıplara neden olan hastalıklar arasında fertilitite ve jinekolojik problemler ön planda bildirilmiş olsa da (Yalçın ve ark. 2006; Yıldız 2008), bu çalışmada elde edilen sıralama mevcut literatürden farklılık göstermektedir. Bu durum; çalışma bölgelerindeki bakım-besleme yöntemleri, yetiştirme tecrübelerinin artması ve zamanla iyileşen tedavi başarı oranlarıyla açıklanabilir.

Araştırmada tespit edilen ayak hastalıkları (%32.29), önceki çalışmalarda (Canpolat ve ark. 2003; Yalçın ve ark. 2006; Yıldız 2008) bildirilen oranlardan (%0.3; %30) daha yüksek bulunmuştur. Miller ve Dorn (1990) tarafından bildirilen mastitis (%26) ve fertilitite problemleri (%13) verileri, mevcut çalışmamızdaki mastitis (%23.13) ve fertilitite (%15.64) bulgularıyla benzerlik göstermektedir. Ancak ayak hastalıklarındaki %32.29'luk oran, Şındak ve ark. (2003) tarafından bağlı duraklı ahırlar için bildirilen %93.8'lik değerden düşüktür. Bu farkın, bölgedeki yetiştirme biçiminden ve işletme ölçeklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Tespit edilen bulgu ilgili bölgede ayak hastalıklarına yönelik bilgilendirme ve eğitim

çalışmaları yapılmasının işletme kârlılık ve verimliliği açısından önemli olduğunu ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada metabolizma hastalıkları insidens oranı (%25.45) daha önce yapılan çalışmalarda bildirilen (%1-12) ortalama değerlerden (McLaren ve ark. 2006; Yalçın ve ark. 2006; Yıldız 2008) daha yüksek bulunmuştur. Bu durum, işletmelerde geçiş dönemi yönetiminin yetersizliği, yüksek verim baskısı ve rasyon dengesizlikleri gibi faktörlerle ilişkili olabilir. Ayrıca yüksek verim hedefi doğrultusunda yoğun üretim modelinin benimsenmesi, metabolik stres riskini artırarak insidens oranlarının yükselmesine katkı sağlamış olabilir.

Fertilite problemleri özelinde, literatürde bildirilen oranlar %30-32 düzeyinde iken çalışmamızda %15.64'lük bir insidans saptanmıştır. Bu düşük oranın, bölgedeki işletmelerin çoğunlukla küçük ölçekli aile işletmesi olması ve yüksek süt verimi zorlaması olmayan hayvanların bulunmasıyla ilişkili olduğu değerlendirilmektedir. Klinik metritis maliyetleri ise vaka başına ortalama 144-230 US\$ olarak hesaplanmış olup; Sarıözkan (2012) (223 US\$) ve Bartlett ve ark. (1986) (240 US\$) bulgularıyla uyumludur.

Çalışmada meme problemleri toplam hastalıklar içerisinde %23.13 oranında belirlenmiştir. Bu grubun büyük çoğunluğunu (%81.29) mastitis vakaları oluşturmaktadır. Bu yapısal meme problemleri ve meme ödemi daha sınırlı düzeyde kalmıştır. Bu dağılım, meme sağlığı sorunlarının ağırlıklı olarak enfeksiyöz kaynaklı olduğunu göstermektedir. Mastitisin meme problemleri içindeki baskın konumu, sağım hijyeni, barınak koşulları ve laktasyon yönetimi gibi faktörlerin sürü sağlığı açısından kritik önem taşıdığını düşündürmektedir. Türkiye genelinde yapılan bir meta-analiz çalışmasında subklinik mastitis prevalansının %44.13 düzeyinde olduğu ve hastalığın şiddetine bağlı olarak hayvan başına önemli ekonomik kayıplara yol açtığı bildirilmiştir (Arikan ve ark. 2024). Buna karşın yapısal meme problemlerinin düşük oranda görülmesi, işletmelerde travmatik etkenlerin veya genetik yatkınlığın daha sınırlı düzeyde olabileceğine işaret edebilir. Meme problemleri özellikle süt verimi ve süt kalitesi üzerinde doğrudan etkili olduğundan, bölge işletmeleri açısından hem üretim kaybı hem de tedavi giderleri bakımından önemli ekonomik sonuçlar doğurabilecek niteliktedir. Bu nedenle meme sağlığının korunmasına yönelik koruyucu uygulamaların sürü yönetiminde öncelikli alanlardan biri olması gerekmektedir.

Türkiye'de epidemik hastalıkların ekonomisi üzerine çalışmalar oldukça kısıtlıdır (Şentürk ve Yalçın 2005). Türkiye'de epidemik hastalıkların ekonomik etkilerine yönelik yapılan modelleme çalışmalarında, Lumpy Skin Disease için geliştirilen SEIR modeli sonuçları, salgınların üretim kayıpları üzerinde önemli ve öngörülebilir etkiler oluşturduğunu göstermektedir (Mat ve ark. 2021). Şap hastalığı kaynaklı verim kayıpları literatürde %15 ile %44 arasında değişirken (Tufan 1993; Ertan 2015), bu çalışmada ortalama verim kaybı %13-16 olarak saptanmıştır. Şentürk ve Yalçın (2008) şap hastalığına bağlı ekonomik kaybı hayvan başına ortalama 86-493 US\$ arasında bildirmiştir. Bu çalışmada ise kaybın vaka başına ortalama 145-221 US\$ arasında değiştiği belirlenmiştir. Çalışmalar arasındaki bu farklılığın; işletme yapısı, hastalığın şiddeti, ekonomik kayıp hesaplamasında kullanılan maliyet kalemleri ve bölgesel üretim koşullarındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Gelişmiş ülkelerin aksine Türkiye'de itlaf yerine tedavi ve koruma yöntemlerinin

benimsenmesi, maliyet kalemlerinin yapısını değiştirmektedir.

Brucella ve tüberküloz gibi zoonoz hastalıklar, yüksek zorunlu elden çıkarma maliyetleriyle dikkat çekmektedir. Çalışmamızda brucella pozitif hayvanların net mali kaybı hayvan başına 25.000 TL olarak hesaplanmıştır. Tüberküloz vakalarında ise, Tarım ve Orman Bakanlığı tazminatlarına rağmen işletme başına kaybın 450.000 TL'ye (iki işletme toplamı 900.000 TL) ulaşması, bu hastalıkların eradikasyonunun ekonomik sürdürülebilirlik için çok önemli olduğunu ortaya koymaktadır.

Bu çalışma, hayvansal üretimin bölge ekonomisi açısından önemli bir gelir kaynağı olduğunu açıkça göstermektedir. Ancak üretimin sürdürülebilirliğinde hayvan hastalıklarının kritik bir risk unsuru oluşturduğu anlaşılmıştır. Üreticilerin hastalıkların neden olduğu ekonomik kayıplar ve bunun işletme ekonomisi açısından önemi konusunda bilgilendirilmelerinin ve farkındalık oluşturulmasının bir zorunluluk olduğu anlaşılmıştır. Başta çalışma alanı olmak üzere ülke genelinde bu tür çalışma ve yayınlar ile eğitici çalışmaların yapılması ülke ekonomisi, tüketici sağlığı ve hayvan refahı açısından faydalı olacaktır.

Hayvancılık işletmelerinde kârlılık ve verimlilik aynı zamanda da sürü büyüklüğünün korunması ve artırılması için kritik önemi olan özellikle 0-6 aylık buzağı dönemindeki kayıpların yoğunlaştığı tespit edilmiştir. Buzağı ölümlerinin toplam kayıplar içindeki yüksek payı, Türkiye'de bildirilen yüksek buzağı mortalite oranlarıyla paralellik göstermekte olup, sürü yenilenmesi ve işletme sürdürülebilirliği açısından kritik bir risk faktörü oluşturmaktadır (Günlü 2020b). Buzağı kayıplarının hem ulusal ekonomi hem de işletme ekonomisi açısından önemli bir mali yük oluşturduğu anlaşılmaktadır. Bu konuda da üreticilere yönelik bilgilendirme ve farkındalık eğitimlerinin yapılması bir zorunluluk olarak görülmektedir. İncelenen bölgede endemik olarak en sık görülen hastalık ayak hastalıkları (%32.29) iken, vaka başına en yüksek maliyetin metritis (3.920 TL) ve meme problemlerinden (3.750 TL) kaynaklandığı görülmüştür. Bakım ve besleme koşullarının iyileştirilmesiyle asidoz ve postpartum kayıpların önemli ölçüde azaltılabileceği öngörülmektedir.

İncelenen 601 vakada oluşan toplam 10.509.000 TL'lik erken elden çıkarma kaybının büyük oranda alınacak önlemler ve işletmelere bakım besleme ve etkili sürü sağlığı ve yönetimi yöntemleri ile sakinleştirilebilir nitelikte olduğu saptanmıştır. Bu kayıpların temel nedenleri; eğitim yetersizliği, küçük ölçekli işletme yapısı ve koruma-kontrol önlemlerindeki takip eksikliği olduğu anlaşılmıştır.

Araştırma kapsamına alınan ilçelerde şap ve brucella gibi epidemik hastalıklarda aşılama programlarının ekonomik zararı minimize ettiği görülmüştür. Bu bağlamda Tarım ve Orman Bakanlığı'nın aşılama kampanyalarını, yetiştirici bilincini artıracak eğitimlerle desteklemesi ve en azından bölgede aşıli arılık sağlanıncaya kadar hastalıklarla etkili mücadele programlarının uygulanması gerektiği açıkça anlaşılmıştır.

Sonuç olarak, bölgedeki hayvancılık işletmelerinin karlılığını artırmak için koruyucu hekimlik uygulamalarının yaygınlaştırılması, işletme ölçeklerinin büyütülmesi için çalışılması ve işletmelerin daha modern ve sağlıklı altyapıya kavuşmalarının sağlanmasına yönelik destek, teşvik ve kalkınma modellerinin oluşturulmasının gerekliliği anlaşılmıştır. Bu açıdan yürütülmekte olan hayvansal üretim politikalarının yeniden gözden

geçirilmesi ve değerlendirilmesinin zorunluluğu ortaya konulmuştur.

Çalışmanın Sınırlılıkları

Çalışmamızın metodolojik açıdan bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. Araştırmamızın temel amacı işletmelerdeki hastalıkların ekonomik boyutunu ve maliyet kalemlerini ortaya koymak olduğu için yalnızca betimsel istatistikler kullanılmıştır. Bu çalışmada örneklem büyüklüğü, araştırma evrenini temsil edecek minimum işletme sayısını belirlemek amacıyla örneklem hacmi formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Ülke genelinde olduğu gibi bölgede de yaygın ve fonksiyonel hastalık kayıt sistemi olmadığı için yapılan hesaplamalar önemli oranda tahminlere dayanmaktadır. Ancak hastalıkların ekonomik etkilerinin daha da önem kazanması ve simülasyon yöntemlerinin kullanılmasına başlaması nedeniyle kayıt tutmanın yaygınlaştırılmasında, pratiğe aktarılmasında ve teknolojik gelişmelerden daha etkin yararlanılabilmesinde, politika uygulayanların önlem ve desteklerinin sektörün tüm paydaşlarına ve ülke ekonomisine katkısının olacağı daha sık vurgulanmalıdır. Bunun sonucu gelecekteki bu tip çalışmaların analitik karşılaştırmaları ve güç analizlerini içerecek şekilde planlanması literatüre ek katkı sağlayabilecektir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

TEŞEKKÜR VE BİLGİLENDİRME

Bu çalışma Hasan Hüseyin ÖZDEMİR isimli yazarın yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

Bu çalışmanın tamamlanmasında Delphi uzman anketine zaman ayırıp katkı sağlayan Sarayönü ve Kadınhanı ilçelerinde görev yapan Veteriner Hekimlere ve araştırmaya katılarak veri temin formlarını cevaplayan yetiştiricilere teşekkür ederiz.

YAZAR KATKILARI

Fikir/Kavram: AG, HHÖ
Denetleme/Danışmanlık: AG
Veri Toplama ve/veya İşleme: HHÖ
Analiz ve/veya Yorum: HHÖ, AG
Makalenin Yazımı: HHÖ, AG
Eleştirel İnceleme: AG

KAYNAKLAR

- Akın AC (2023). Hayvan Hastalıklarından Kaynaklanan Ekonomik Kayıplar. Günlü A (Ed). Hayvan Sağlığı Ekonomisi (s. 65-100). Akademisyen Yayınevi, Ankara.
- Arı HO, İşlek E, Özatkan Y et al. (2020). Türkiye’de Zoonotik Hastalıkların Hastalık Yükü ve Maliyeti. *TÜSPE Rapor: 2020/1*, TÜSPE Yayınları, Ankara.
- Arikan MS, Mat B, Alkan H et al. (2024). Determination of subclinical mastitis prevalence in dairy cows in Türkiye through meta-analysis and production loss calculation. *Pak Vet J*, 44(2), 391-399.
- Bartlett PC, Kirk JH, Wilke MA et al. (1986). Metritis complex in Michigan Holstein-Friesian cattle: Incidence, descriptive epidemiology and estimated economic impact. *Preventive Veterinary Medicine*, 4(3), 235-248.
- Can MF (2009). Hayvan sağlığı ekonomisi alanında kullanılan modelleme teknikleri ve çeşitli modelleme çalışmaları. *Vet Hekim Der Derg*, 80(3), 7-12.
- Canpolat İ, Bulut S (2003). Elazığ ve çevresinde sığırlarda görülen ayak hastalıklarının insidansı üzerine gözlemler. *FÜ Sağlık Bil Derg*, 17(3), 155-160.

- Dehove A, Commault J, Petitclerc M, Teissier M, Macé J (2012). Economic analysis and costing animal health: a literature review of methods and importance. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 31(2), 605-617.
- Ertan D (2015). AB Üyelik Sürecinde Türkiye’de Sığırlarda Görülen Şap, Tüberküloz ve Bruselloz Hastalıklarının Kontrolü ve Eradikasyonu: Yöntemler ve Maliyet Analizi. Uzmanlık Tezi, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Ankara, Türkiye.
- FAO (2019). Climate change and the global dairy cattle sector: The role of the dairy sector in a low-carbon future. Erişim Tarihi: 12.01.2023. Erişim Adresi: <https://www.fao.org/3/CA2929EN/ca2929en.pdf>
- Günlü A (2020a). Hayvan Hastalıklarının Ekonomik Önemi. Çoban Ö (Ed). *Sürü Sağlığı Yönetimi ve Ekonomisi* (s. 4-27). Atatürk Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Yayını, Erzurum.
- Günlü A (2020b). Buzağı Kayıpları ve Buzağı Hastalıklarının Ekonomik Değerlendirmesi. Erdem ve ark. (Ed). *Buzağı Kayıplarının Önlenmesinde Buzağı Sağlığı ve Yetiştiriciliği* (s.139-145). Medisan Yayınevi, Ankara.
- Israel GD (2009). Determining sample size. University of Florida, IFAS Extension, PEOD6.
- Kappes A, Tozooneyi T, Shakil G et al. (2023). Livestock health and disease economics: A scoping review of selected literature. *Front Vet Sci*, 10, 1168649.
- Mat B, Arikan MS, Akin AC et al. (2021). Determination of production losses related to lumpy skin disease among cattle in Turkey and analysis using SEIR epidemic model. *BMC Veterinary Research*, 17(1), 1-10.
- McLaren CJ, Lissemore KD, Duffield TF et al. (2006). The relationship between herd level disease incidence and a return over feed index in Ontario dairy herds. *Can Vet J*, 47, 767-773
- Miller GY, Dorn CR (1990). Cost of dairy cattle diseases to producers in Ohio. *Preventive Veterinary Medicine*, 8(2-3), 171-182.
- Sarıözkan S (2012). Süt sığırcılığı işletmelerinde fertilite bozukluklarından kaynaklanan finansal kayıpların hesaplanması. *Ankara Üni Vet Fak Derg*, 59, 55-60.
- Scheaffer RL, Mendenhall III W, Ott RL, Gerow KG (2011). Elementary Survey Sampling. 7. Edition. Cengage Learning, Boston, USA.
- Schroback P, Dennis G, Li Y et al. (2023). Approximating the global economic (market) value of farmed animals. *Glob Food Sec*, 39, 100722.
- Sipahi C (2023). Hayvan Hastalıklarından Kaynaklanan Ekonomik Kayıplar. Günlü A (Ed). Hayvan Sağlığı Ekonomisi (s. 1-30). Akademisyen Yayınevi, Ankara.
- Şentürk B, Yalçın C (2005). Financial impact of foot-and-mouth disease in Turkey: Acquisition of required data via Delphi expert opinion survey. *Vet Med Czech*, 50(10), 451-460.
- Şentürk B, Yalçın C (2008). Production Losses Due to Endemic Foot-and-Mouth Disease in Cattle in Turkey. *Turk J Anim Sci*, 36(2), 433-440.
- Şındak N, Keskin O, Biricik HS, Sertkaya H (2003). Şanlıurfa ve yöresinde sığır ayak hastalıklarının prevalansı. *YYÜ Vet Fak Derg*, 14(1), 14-18.
- Thompson D, Muriel P, Russell D et al. (2002). Economic cost of the foot and mouth disease outbreak in the United Kingdom in 2001. *Rev Sci Tech*, 21(3), 675-87.
- Tufan M (1993). An Evaluation of the Monitoring and Control of Foot and Mouth Disease in Turkey. MSc. Thesis, University of Reading, United Kingdom.
- van Soest FJS, Santman-Berends IMG, Lam TJGM et al. (2016). Failure and preventive costs of mastitis on Dutch dairy farms. *J Dairy Sci*, 99(10), 8365-8374.
- Yalçın C (2000). Financial losses due to infertility in dairy herds. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg*, 40(1), 39-47.
- Yalçın C, Sarıözkan S, Yıldız AŞ, Günlü A (2006). Türkiye Damızlık Sığır Yetiştiricileri Merkez Birliği’ne Bağlı Süt Sığırcılık İşletmelerinde Endemik Hastalıklar ve İşletme Düzeyinde Meydana Getirdiği Ekonomik Kayıplar Projesi Raporu.
- Yalçın C, Sarıözkan S, Yıldız AŞ, Günlü A (2008). Burdur, Kırklareli ve Konya illerindeki süt sığırcılığı işletmelerinde ayak hastalıklarından kaynaklanan finansal kayıplar. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 57(2), 99-104.
- Yaylak E (2003). Siyah Alaca ineklerde sürüden çıkarılma nedenleri, sürü ömrü ve damızlıkta yararlanma süresi. *Akdeniz Üniv Ziraat Fak Derg*, 16(2), 179-185.
- Yıldız AŞ (2008). Ankara İli Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birliği’ne Bağlı Süt Sığırcılığı İşletmelerinde Bazı Endemik Hastalıkların İşletme Düzeyinde Meydana Getirdiği Ekonomik Kayıplar. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.
- Yıldız AŞ, Yalçın C (2014). Ankara ili süt sığırcılığı işletmelerinde klinik mastitis kaynaklı ekonomik kayıplar. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 2(2), 55-62.



Endemik *Sideritis galatica* (Lamiaceae) Toprak Üstü Kısımlarının Fenolik İçeriği ve *in vitro* Antioksidan Aktivitesine Çözücülerin Karşılaştırmalı Etkisi

Damla ARSLAN ACARÖZ* 

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 03200, Afyonkarahisar, Türkiye

Geliş Tarihi: 23.04.2026

Kabul Tarihi: 10.07.2026

ÖZ

Sideritis galatica Bornm. (Lamiaceae), Türkiye'ye özgü endemik bir bitki türüdür. Türkiye'ye özgü bu tür, geleneksel olarak "dağ çayı" biçiminde tüketilen ve fenolik bileşiklerce zengin *Sideritis* cinsinin bir üyesidir. Bu çalışmada Afyonkarahisar'dan toplanan *S. galatica* bitkisinin toprak üstü kısımlarından metanol, aseton ve su ile hazırlanan ekstraktların toplam fenolik içeriği ve *in vitro* antioksidan aktivitesi karşılaştırmalı olarak incelendi. Toplam fenolik içerik Folin-Ciocalteu, toplam antioksidan kapasite fosfomolibden ve radikal süpürme aktivitesi 25, 50 ve 100 ppm konsantrasyonlarda 2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) yöntemleriyle belirlendi. Veriler ANOVA, Tukey HSD, Pearson korelasyonu, doğrusal regresyon ve temel bileşen analizi (PCA) ile değerlendirildi. Metanol (36.60 ± 0.50 mg GAE/g) ve aseton (36.57 ± 1.06 mg GAE/g) ekstraktları benzer fenolik içerik sunarken, sulu ekstrakt anlamlı düşük bulundu (22.79 ± 0.59 mg GAE/g; $p < 0.001$). En yüksek antioksidan kapasite aseton ekstraktında saptandı (125.43 ± 10.10 μ mol AAE/g). DPPH inhibisyonu konsantrasyonla arttı; çözücü×konsantrasyon etkileşimi anlamsızdı ($p = 0.929$). Fenolik içerik ile antioksidan kapasite arasında güçlü pozitif ilişki gözlemlendi ($R^2 = 0.879$). PCA ve permütasyonel çok değişkenli varyans analizi (PERMANOVA) çözücü gruplarının belirgin biçimde ayrıştığını doğruladı ($R^2 = 0.942$; $p = 0.010$). Bulgular *S. galatica*'nın antioksidan potansiyelinin çözücü seçimine bağlı olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidanlar, Bitki ekstraktları, Fenoller, Kimyasal fraksiyonlama, Lamiaceae, *Sideritis*.

ABSTRACT

A Comparative Evaluation of Solvent Effects on the Phenolic Content and *in vitro* Antioxidant Activity of Aerial Parts of Endemic *Sideritis galatica* (Lamiaceae)

Sideritis galatica Bornm. (Lamiaceae) is an endemic plant species native to Türkiye. This Türkiye-endemic species belongs to the genus *Sideritis*, whose members are traditionally consumed as 'mountain tea' and are rich in phenolic compounds. In this study, the total phenolic content and *in vitro* antioxidant activity of extracts prepared from the aerial parts of *S. galatica* collected from Afyonkarahisar Province using methanol, acetone, and water were comparatively investigated. Total phenolic content was determined using the Folin-Ciocalteu method, total antioxidant capacity using the phosphomolybdenum method, and radical scavenging activity using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method at concentrations of 25, 50, and 100 ppm. The data were analyzed using ANOVA, Tukey's HSD test, Pearson correlation, linear regression, and principal component analysis (PCA). While the methanol (36.60 ± 0.50 mg GAE/g) and acetone (36.57 ± 1.06 mg GAE/g) extracts exhibited similar phenolic content, the aqueous extract was found to be significantly lower (22.79 ± 0.59 mg GAE/g; $p < 0.001$). The highest antioxidant capacity was detected in the acetone extract (125.43 ± 10.10 μ mol AAE/g). DPPH inhibition increased with concentration; the solvent×concentration interaction was non-significant ($p = 0.929$). A strong positive correlation was observed between phenolic content and antioxidant capacity ($R^2 = 0.879$). PCA and permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) confirmed that the solvent groups were markedly separated ($R^2 = 0.942$; $p = 0.010$). The findings indicate that the antioxidant potential of *S. galatica* depends on the choice of solvent.

Keywords: Antioxidants, Chemical fractionation, Lamiaceae, Phenols, Plant extracts, *Sideritis*.

GİRİŞ

Lamiaceae, dünya genelinde yaklaşık 7000 türü barındıran ve *Sideritis*, *Salvia* ile *Mentha* gibi öne çıkan cinsleri içeren geniş bir bitki familyasıdır (Romanucci ve ark. 2017).

Sideritis cinsi, Akdeniz havzasındaki geniş yayılımı, Türkiye'deki yüksek tür çeşitliliği ve belirgin endemizmiyle bu familya içinde özel bir konuma sahiptir (Aneva ve ark. 2019; Öztürk Sarıkaya ve Zehiroğlu 2023). Cins adı Yunanca "demir" anlamına gelen *sideros*



kelimesinden türemiş olup antik çağda metal silahların açtığı yaraların tedavisinde kullanılması geleneğine dayanmaktadır (Żyżelewicz ve ark. 2020).

Türkiye'de ve Akdeniz coğrafyasında "dağ çayı" adıyla bilinen *Sideritis* türleri, öksürük, soğuk algınlığı, bronşit, sindirim şikâyetleri ve inflamatuvar durumlarda infüzyon veya dekoksiyon biçiminde tüketilmektedir (Petreska ve ark. 2011; Çarıkçı 2020; Bouymajane ve ark. 2022; Altun 2023). Farklı *Sideritis* türlerinin anti-inflamatuvar, antiülseratif, spazmolitik, analjezik, antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteler sergilediği bildirilmiş; bu etkilerin temelinde terpenoidler, steroller, kumarinler, flavonoidler, feniletanoid glikozitler ve hidroksisinnamik asit türevleri bakımından zengin fitokimyasal profilin yer aldığı gösterilmiştir (Romanucci ve ark. 2017; Żyżelewicz ve ark. 2020; Acaröz ve ark. 2021; Bouymajane ve ark. 2022; Öztürk Sarıkaya ve Zehiroğlu 2023).

Oksidatif stres, serbest radikal üretimi ile antioksidan savunma arasındaki dengenin bozulmasıyla ortaya çıkar ve kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ile nörodejeneratif hastalıklar gibi kronik durumlarla ilişkilendirilmektedir (Jamshidi-kia ve ark. 2020). Sentetik antioksidanların yüksek dozlarda toksik ya da karsinojenik etkiler sergileyebildiğine ilişkin bulgular, fenolik bileşiklerce zengin tıbbi ve aromatik bitkilere yönelik ilgiyi artırmıştır (Jamshidi-kia ve ark. 2020; Bouymajane ve ark. 2022; Can Gündüz ve ark. 2025; Samuel ve ark. 2026). *Sideritis* türlerinde antioksidan aktivitenin fenolik ve flavonoid içerikle ilişkili olduğu, ancak bu ilişkinin çözücü, ekstraksiyon tekniği ve analitik yöntemle bağlı olarak değişebildiği rapor edilmiştir; metanol ve aseton ekstraktları çoğu çalışmada öne çıkarken bazı analizlerde sulu ekstraktlar daha etkili bulunmuştur (Zengin ve ark. 2014; Sagir ve ark. 2017; Devenci ve ark. 2018; Sarikurkcu ve ark. 2020; Şimşek Sezer ve Uysal 2021). Ayrıca hasat mevsimi ve rakım gibi çevresel etkenlerin de sekonder metabolit profilini belirleyici olduğu gösterilmiştir (Chrysargyris ve ark. 2021).

Bu kapsamlı literatüre karşın, endemik bir tür olan *Sideritis galatica* (*S. Galatica*) özelinde yürütülen çalışmalar sınırlı kalmakta; mevcut veriler ağırlıklı olarak yeni bir diterpen izolasyonu, mineral profili, çok-hedefli biyoaktivite taramaları ve antimikrobiyal aktivite üzerinde yoğunlaşmaktadır (Dişli ve ark. 2002; Zengin ve ark. 2014; Korkmaz ve ark. 2017; Acaröz ve ark. 2021). Bu çalışmada Afyonkarahisar'dan toplanan endemik *S. galatica*'nın toprak üstü kısımlarından metanol, aseton ve su ile hazırlanan ekstraktlar; Folin-Ciocalteu yöntemiyle toplam fenolik içerik, fosfomolibden yöntemiyle toplam antioksidan kapasite ve 25, 50 ve 100 ppm konsantrasyonlarda DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal süpürme aktivitesi açısından karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Organik çözücülerin sulu ekstrakta göre daha yüksek fenolik içerik ve antioksidan aktivite sergileyeceği ile fenolik içerik ile antioksidan göstergeler arasında pozitif doğrusal bir ilişki gözleneceği hipotezleri sınılandı; veriler korelasyon, regresyon, temel bileşen analizi (PCA) ve permütasyonel çok değişkenli varyans analizi (PERMANOVA) ile incelendi.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışma canlı ya da ölü hayvan, hayvan dokusu, mezbaha materyali veya atık fetüs kullanımını içermediğinden hayvan deneyleri etik kurul onayı gerektirmemektedir.

Çalışmada kullanılan bitki materyali, Afyonkarahisar ili Şuhut ilçesinden toplanan *S. galatica*'nın toprak üstü kısımlarıdır. Tür tanımlaması doğrulandıktan sonra herbaryum örneği Afyon Kocatepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbaryumu'na kayıt ettirildi (herbaryum no. AKU-8315).

S. galatica'nın toprak üstü kısımları gölgede kurutulduktan sonra laboratuvar değirmeninde yaklaşık iki dakika öğütüldü. Knörle (2012) tarafından tanımlanan yöntem modifiye edilerek distile su, metanol ve aseton ile üç farklı ekstrakt hazırlandı. Her bir hazırlıkta 20 g toz bitki materyali 400 mL çözücüye eklendi ve oda sıcaklığında karıştırıldı. Süspansiyonlar süzgeç kâğıdından geçirildi; süzüntüler döner buharlaştırıcıda (Büchi Labortechnik AG, İsviçre) yoğunlaştırılarak ham ekstraktlar elde edildi ve analiz edilene kadar 4 °C'de saklandı. Toplam fenolik içerik TPC) Folin-Ciocalteu yöntemiyle (Ainsworth ve Gillespie 2007), toplam antioksidan kapasite (TAC) fosfomolibden yöntemiyle (Prieto ve ark. 1999) ve serbest radikal süpürme aktivitesi DPPH testiyle (Blois 1958) belirlendi.

Tüm istatistiksel değerlendirmeler R yazılımında (sürüm 4.5.1; R Core Team 2025) gerçekleştirildi. Her deneysel ölçüm üç bağımsız tekrar hâlinde yürütülmüş olup sonuçlar ortalama±standart sapma biçiminde sunuldu. Parametrik test varsayımları *car* paketi (sürüm 3.1.3) aracılığıyla Shapiro-Wilk testi (artıkların normal dağılımı) ve Levene testi (varyans homojenliği) ile test edildi.

Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite verileri, çözücü türünün tek bağımsız değişken olarak tanımlandığı tek yönlü ANOVA ile değerlendirildi. DPPH radikal süpürme aktivitesi için ise çözücü ve konsantrasyonun (25, 50 ve 100 ppm) sabit faktörler olarak girildiği ve etkileşim teriminin modele dâhil edildiği iki yönlü ANOVA modeli uygulandı. Çoklu ikili karşılaştırmalar Tukey HSD testiyle yapıldı; homojen alt gruplar, *emmeans* paketi (sürüm 2.0.0) üzerinden *multcomp* paketinin (sürüm 1.4.30) *cld* fonksiyonuyla harflerle gösterildi. Etki büyüklükleri kısmi eta kare (η^2p) olarak *effects* paketi (sürüm 1.0.1) ile hesaplandı.

Parametreler arasındaki ilişkiler, üç çözücü grubunun havuzlanmış verisi üzerinden ($n=9$) Pearson korelasyon katsayılarıyla değerlendirildi; toplam fenolik içerik ile diğer antioksidan göstergeler arasındaki doğrusal ilişkiler basit doğrusal regresyon modelleriyle incelendi ve her model için denklem, belirlilik katsayısı (R^2), eğimin %95 güven aralığı (GA) ve p-değeri bildirildi. Çok değişkenli örüntü analizi için beş antioksidan değişken-toplam fenolik içerik (TPC), TAC ile 25, 50 ve 100 ppm'de ölçülen DPPH inhibisyonu (sırasıyla DPPH25, DPPH50 ve DPPH100)-standartlaştırılarak (merkezlenip ölçeklenerek) temel bileşen analizine (PCA) tabi tutuldu. Örneklem yeterliliği *psych* paketi (sürüm 2.6.3) ile Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) ölçütüne göre değerlendirildi ve değişkenler arası korelasyon yapısının PCA için uygunluğu ise Bartlett küresellik testiyle değerlendirildi. Çözücü gruplarının çok değişkenli uzaydaki ayrışması, 999 permütasyonla oluşturulan Öklid uzaklık matrisi üzerinden PERMANOVA ile test edildi (*vegan* paketi, sürüm 2.7.3).

Tüm analizlerde istatistiksel anlamlılık eşiği $p<0.05$ olarak belirlendi. Grafikler *ggplot2* (sürüm 3.5.2) ve *patchwork* (sürüm 1.3.2) paketleriyle üretildi; çok değişkenli görselleştirmelerde ayrıca *corrplot* (sürüm 0.95) ve *ggrepel* (sürüm 0.9.6) paketleri kullanıldı.

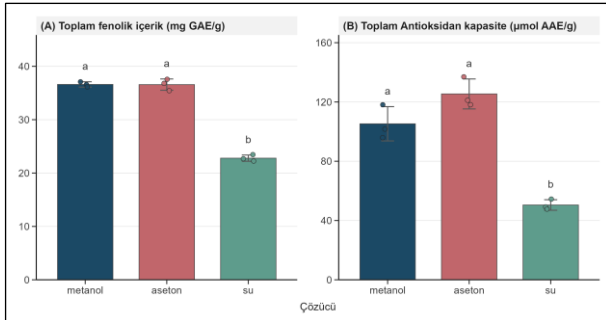
BULGULAR

Toplam Fenolik İçerik

Ekstraktların çözücü türüne göre gallik asit eşdeğeri (GAE) cinsinden ifade edilen TPC Şekil 1A'da sunuldu. Metanol ve aseton ekstraktlarının ortalama değerleri birbirine oldukça yakın bulunurken (sırasıyla 36.60±0.50 ve 36.57±1.06 mg GAE/g), sulu ekstrakt yalnızca 22.79±0.59 mg GAE/g düzeyinde kaldı. Tek yönlü ANOVA, çözücünün TPC üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olduğunu ortaya koydu [F(2, 6)=331.88; p<0.001; η^2 p=0.991]. Post-hoc çoklu karşılaştırmalarda metanol ve aseton ekstraktları arasında anlamlı bir fark saptanmazken, sulu ekstrakt ayrı bir istatistiksel grup oluşturdu (Şekil 1A).

Toplam Antioksidan Kapasite

Aynı ekstraktların askorbik asit eşdeğeri (AAE) cinsinden ifade edilen TAC değerleri Şekil 1B'de gösterildi. En yüksek kapasite aseton ekstraktında saptandı (125.43±10.10 μ mol AAE/g); bunu metanol ekstraktı izledi (105.28±11.56 μ mol AAE/g). Sulu ekstrakt ise 50.49±3.56 μ mol AAE/g ile en düşük değeri gösterdi. ANOVA sonuçları çözücü türünün TAC üzerinde anlamlı bir etkisi olduğunu ortaya koydu [F(2, 6)=54.49; p<0.001; η^2 p=0.948]. Post-hoc karşılaştırmalar metanol ve aseton ekstraktlarını aynı istatistiksel grupta birleştirirken, sulu ekstraktı ayrı bir grupta konumlandırdı (Şekil 1B). Niceliksel olarak değerlendirildiğinde, sulu ekstraktın kapasitesi aseton değerinin yaklaşık %40'ına ve metanol değerinin yaklaşık %48'ine karşılık gelmektedir.



Şekil 1: Üç farklı çözücü (metanol, aseton, su) ile hazırlanan *S. galatica* ekstraktlarının toplam fenolik içeriği (A, mg GAE/g) ve toplam antioksidan kapasitesi (B, μ mol AAE/g). Sütunlar ortalama değerleri, hata çubukları standart sapmayı ($\pm$ SD), noktalar bireysel tekrar değerlerini göstermektedir (n=3). Farklı harfler Tukey HSD testine göre anlamlı farklılıkları ifade eder (p<0.05). GAE, gallik asit eşdeğeri; AAE, askorbik asit eşdeğeri; TPC, toplam fenolik içerik; TAC, antioksidan kapasite; SD, standart sapma.

Figure 1: Total phenolic content (A, mg GAE/g) and antioxidant capacity (B, μ mol AAE/g) of *S. galatica* extracts prepared using three different solvents (methanol, acetone, water). Bars represent mean values, error bars indicate standard deviation ($\pm$ SD), and dots represent individual replicate values (n=3). Different letters indicate significant differences according to Tukey's HSD test (p<0.05). GAE, gallic acid equivalent; AAE, ascorbic acid equivalent; TPC, total phenolic content; TAC, total antioxidant capacity; SD, standard deviation.

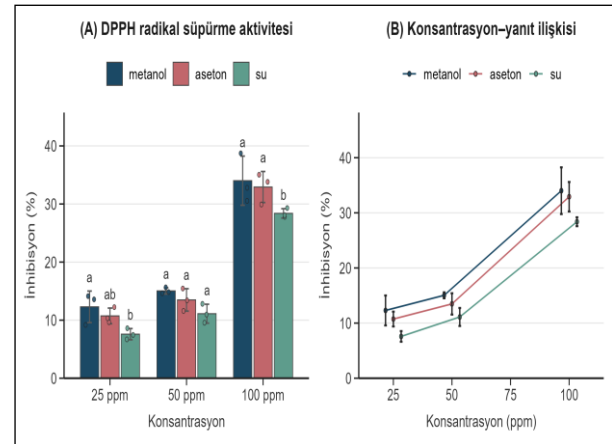
Radikal Süpürme Aktivitesi (DPPH)

Çözücü türü ve konsantrasyonun DPPH radikal süpürme aktivitesi üzerindeki etkileri iki yönlü ANOVA ile değerlendirildi. Parametrik test varsayımları karşılandı

(Shapiro-Wilk p=0.595; Levene p=0.715). ANOVA, DPPH inhibisyon yüzdesi üzerinde hem çözücünün [F(2, 18)=11.38; p<0.001; η^2 p=0.558] hem konsantrasyonun [F(2, 18)=260.07; p<0.001; η^2 p=0.967] anlamlı temel etkiler sergilediğini ortaya koydu; konsantrasyon etkisi tek başına toplam varyansın yaklaşık %97'sini açıkladı. Çözücü×konsantrasyon etkileşimi anlamlı değildi [F(4, 18)=0.21; p=0.929; η^2 p=0.045]-bu durum çözücülerin göreceli sıralamasının üç konsantrasyon düzeyinde de korunduğunu gösterdi (Şekil 2A).

İnhibisyon yüzdeleri tüm çözücülerde konsantrasyonla arttı; 25 ve 50 ppm'de orta düzeyde kalan değerler 100 ppm'de belirgin biçimde yükseldi (Şekil 2B). Metanol için değerler sırasıyla 12.30±2.71, 15.04±0.54 ve 34.02±4.23; aseton için 10.73±1.35, 13.48±1.93 ve 32.92±2.67; su için 7.58±0.96, 11.11±1.63 ve 28.39±0.81 olarak belirlendi.

Post-hoc Tukey HSD karşılaştırmaları çözücü farklılıklarının konsantrasyona göre değiştiğini gösterdi. 25 ppm'de metanol en yüksek ortalama ile (a) grubunu oluştururken sulu ekstrakt (b) metanolden anlamlı biçimde ayrıştı; aseton ara konumda (ab) yer aldı. 50 ppm'de üç çözücü arasındaki farklar anlamlılığa ulaşmadı ve hepsi aynı grupta (a) birleşti. 100 ppm'de metanol ve aseton ortak grup (a), sulu ekstrakt ise ayrı grup (b) oluşturdu (Şekil 2A).



Şekil 2: Üç farklı çözücü (metanol, aseton, su) ile hazırlanan *S. galatica* ekstraktlarının 25, 50 ve 100 ppm konsantrasyonlardaki DPPH radikal süpürme aktivitesi: (A) gruplandırılmış sütun grafik ve (B) konsantrasyon-yanıt ilişkisi. Sütunlar ve noktalar ortalama değerleri, hata çubukları standart sapmayı ($\pm$ SD) göstermektedir (n=3). Harfler her konsantrasyon düzeyi içinde ayrı ayrı uygulanan Tukey HSD testi sonuçlarını yansıtmaktadır (p<0.05). DPPH, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; SD, standart sapma.

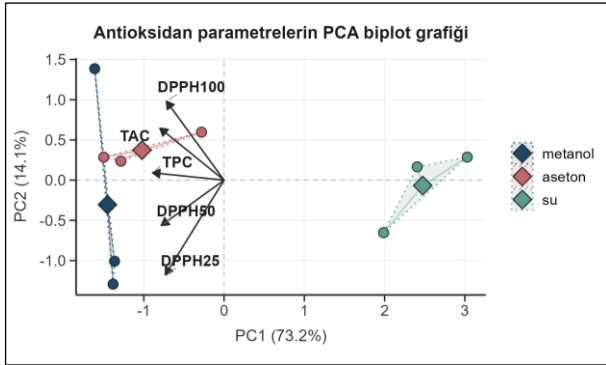
Figure 2: DPPH radical scavenging activity of *S. galatica* extracts prepared using three different solvents (methanol, acetone, water) at 25, 50, and 100 ppm: (A) grouped bar chart and (B) concentration-response relationship. Bars and points represent mean values, error bars indicate standard deviation ($\pm$ SD) (n=3). Letters reflect Tukey's HSD test results applied separately within each concentration level (p<0.05). DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; SD, standard deviation.

Çok Değişkenli Örüntü Analizi (PCA)

Fenolik içerik ve antioksidan aktivite göstergeleri arasındaki çok değişkenli örüntüleri incelemek amacıyla beş değişkenli veri setine (TPC, TAC, DPPH25, DPPH50, DPPH100) temel bileşen analizi uygulandı. Örneklem yeterliliği KMO=0.586 olarak hesaplandı; Bartlett küresellik testi anlamlı bulundu [χ^2 (10)=35.97; p<0.001].

İlk iki temel bileşen toplam varyansın %87.31'ini açıkladı (PC1: %73.20; PC2: %14.11). PC1 üzerinde beş değişkenin yükleri benzer büyüklükte ve aynı (negatif) işaretliydi (-0.408 ile -0.507 arasında). PC2 üzerindeki en yüksek mutlak yükler ise karşıt işaretli iki değişkene aitti: DPPH25 (-0.670) ve DPPH100 (+0.558).

Gözlem skorları PC1-PC2 düzleminde çizildiğinde üç çözücü grubu birbirinden ayrı bölgelerde konumlandı (Şekil 3). Metanol ve aseton ekstraktları negatif PC1 bölgesinde birbirine yakın yer alırken (sırasıyla PC1=-1.45 ve -1.02), sulu ekstraktlar pozitif PC1 bölgesinde toplandı (PC1=+2.48). Üç grubun dışbükey kabukları düzlemde çakışmadı. Grup ayrışmasının istatistiksel anlamlılığı PERMANOVA ile test edildi (Öklid uzaklığı, 999 permütasyon); çözücü türü çok değişkenli yanıt uzayındaki varyansın %94.21'ini açıkladı [$F(2, 6)=48.77$; $R^2 = 0.942$; $p=0.010$].



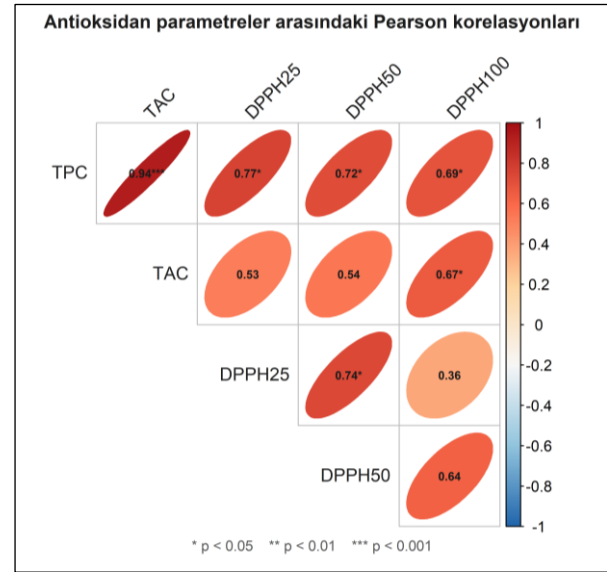
Şekil 3: Üç farklı çözücü (metanol, aseton, su) ile hazırlanan *S. galatica* ekstraktları için beş antioksidan parametrenin (TPC, TAC, DPPH25, DPPH50, DPPH100) PCA biplot grafiği. Oklar değişken yüklemelerini, dairelere bireysel gözlemleri, kare semboller grup merkezlerini, renkli alanlar ise her çözücü grubunun dışbükey kabuğunu göstermektedir (n=3 tekrar/çözücü). İlk iki bileşen toplam varyansın %87.31'ini açıklamaktadır (PC1: %73.20; PC2: %14.11). TPC, toplam fenolik içerik; TAC, toplam antioksidan kapasite; DPPH25/50/100, sırasıyla 25, 50 ve 100 ppm'deki DPPH radikal süpürme inhibisyonu.

Figure 3: PCA biplot of five antioxidant parameters (TPC, TAC, DPPH25, DPPH50, DPPH100) for *S. galatica* extracts prepared using three different solvents (methanol, acetone, water). Arrows represent variable loadings, circles represent individual observations, square symbols represent group centroids, and colored areas indicate the convex hull for each solvent group (n=3 replicates/solvent). The first two components explained 87.31% of the total variance (PC1: 73.20%; PC2: 14.11%). TPC, total phenolic content; TAC, total antioxidant capacity; DPPH25/50/100, DPPH radical scavenging inhibition at 25, 50, and 100 ppm, respectively.

Parametreler Arası Korelasyon Analizi

Toplam fenolik içerik, TAC ve üç farklı konsantrasyondaki DPPH inhibisyonu (DPPH25, DPPH50, DPPH100) arasındaki ilişkiler havuzlanmış ekstrakt örneği üzerinden Pearson korelasyon analiziyle değerlendirildi (n=9); ikili karşılaştırmalara ilişkin r katsayıları ve ham p-değerleri Şekil 4'te sunuldu. En güçlü pozitif ilişki TPC ile TAC arasında gözlemlendi ($r=0.937$; $p<0.001$). TPC ayrıca üç DPPH konsantrasyonunun hepsiyle pozitif ve anlamlı ilişkiler sergiledi: DPPH25 ($r=0.766$; $p=0.016$), DPPH50 ($r=0.724$; $p=0.027$) ve DPPH100 ($r=0.690$; $p=0.040$). TAC ile DPPH parametreleri arasındaki ilişkiler ise orta düzeyde kaldı ve anlamlılığa ulaşmadı: TAC-DPPH25 ($r=0.530$; $p=0.143$), TAC-DPPH50 ($r=0.543$; $p=0.131$), TAC-DPPH100

($r=0.666$; $p=0.050$). DPPH parametreleri kendi aralarında değerlendirildiğinde en yüksek katsayı DPPH25 ve DPPH50 arasında bulundu ($r=0.743$; $p=0.022$); DPPH50-DPPH100 ilişkisi anlamlılık eşiğinin hemen üzerinde kaldı ($r=0.637$; $p=0.065$) ve DPPH25-DPPH100 arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($r=0.360$; $p=0.341$).

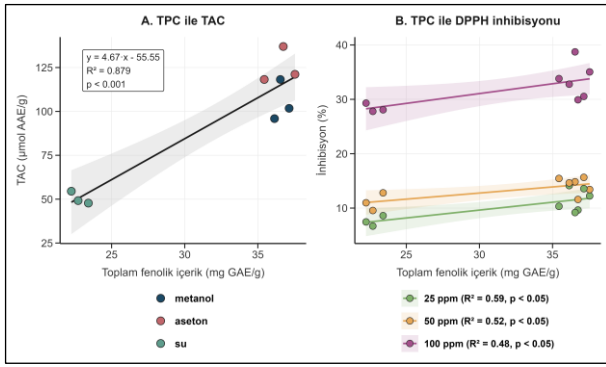


Şekil 4: *S. galatica* ekstraktlarının antioksidan parametreleri (TPC, TAC, DPPH25, DPPH50, DPPH100) arasındaki ikili Pearson korelasyon katsayıları (havuzlanmış veri; üç çözücü×3 tekrar=9 gözlem). Her hücrede elipsin şekli ve rengi korelasyonun yönünü ve gücünü yansıtmakta; kırmızı tonlar pozitif, mavi tonlar negatif korelasyonu göstermektedir. Hücre içindeki sayısal değerler Pearson r katsayılarını, yanındaki yıldızlar ise istatistiksel anlamlılığı ifade eder: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. TPC, toplam fenolik içerik; TAC, toplam antioksidan kapasite; DPPH25/50/100, sırasıyla 25, 50 ve 100 ppm'deki DPPH radikal süpürme inhibisyonu.

Figure 4: Pairwise Pearson correlation coefficients among antioxidant parameters (TPC, TAC, DPPH25, DPPH50, DPPH100) of *S. galatica* extracts (pooled data; three solvents×3 replicates=9 observations). The shape and color of the ellipse in each cell reflect the direction and strength of the correlation; red tones indicate positive, blue tones negative correlations. Numerical values represent Pearson r coefficients; asterisks indicate statistical significance: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. TPC, total phenolic content; TAC, total antioxidant capacity; DPPH25/50/100, DPPH radical scavenging inhibition at 25, 50, and 100 ppm, respectively.

Doğrusal Regresyon Analizleri

Toplam fenolik içerik ile TAC ve üç konsantrasyondaki DPPH inhibisyonu arasındaki doğrusal ilişkiler basit doğrusal regresyon modelleriyle incelendi (n=9). TPC ile TAC arasında güçlü bir doğrusal ilişki belirlendi: $TAC=4.67 \times TPC - 55.55$; $R^2=0.879$; $p<0.001$. Eğim $4.67 \mu\text{mol AAE/g}$ (%95 GA: 3.12–6.22) sıfırdan anlamlı biçimde farklı bulundu (Şekil 5A). DPPH inhibisyonunun TPC üzerine modellenmesi her konsantrasyon için ayrı ayrı gerçekleştirildi ve üç model de istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 5B). 25 ppm'de denklem $DPPH=0.29 \times TPC + 0.96$ (eğim 0.29; %95 GA: 0.07–0.51; $R^2=0.587$; $p=0.016$); 50 ppm'de $DPPH=0.22 \times TPC + 6.04$ (eğim 0.22; %95 GA: 0.03–0.42; $R^2=0.525$; $p=0.027$) ve 100 ppm'de $DPPH=0.36 \times TPC + 20.24$ (eğim 0.36; %95 GA: 0.02–0.70; $R^2=0.477$; $p=0.040$) biçiminde elde edildi. Üç eğimin güven aralıkları birbiriyle örtüştü.



Şekil 5: Toplam fenolik içerik (TPC) ile antioksidan aktivite göstergeleri arasındaki doğrusal regresyon ilişkileri (havuzlanmış veri; üç çözücü×3 tekrar=9 gözlem). (A) TPC ile toplam antioksidan kapasite (TAC) arasındaki ilişki; siyah çizgi en küçük kareler regresyon doğrusunu, gri taralı alan %95 güven bandını göstermektedir. (B) TPC ile üç konsantrasyondaki DPPH inhibisyonu arasındaki ilişki; renkli çizgiler regresyon doğrularını, aynı renkteki taralı alanlar %95 güven bantlarını temsil etmektedir. TPC, toplam fenolik içerik (mg GAE/g); TAC, toplam antioksidan kapasite (μmol AAE/g); DPPH25/50/100, sırasıyla 25, 50 ve 100 ppm'deki DPPH inhibisyon yüzdesi; R^2 , belirlilik katsayısı; GA, güven aralığı.

Figure 5: Linear regression relationships between total phenolic content (TPC) and antioxidant activity indicators (pooled data; three solvents×3 replicates=9 observations). (A) Relationship between TPC and total antioxidant capacity (TAC); the black line represents the least-squares regression line, and the gray shaded area indicates the 95% confidence interval. (B) Relationship between TPC and DPPH inhibition at three concentrations; colored lines represent regression lines, and shaded areas of the same color represent 95% confidence intervals. TPC, total phenolic content (mg GAE/g); TAC, total antioxidant capacity (μmol AAE/g); DPPH25/50/100, DPPH inhibition percentage at 25, 50, and 100 ppm, respectively; R^2 , coefficient of determination; CI, confidence interval.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada *S. galatica*'nın toprak üstü kısımlarından metanol, aseton ve su ile hazırlanan ekstraktların toplam fenolik içeriği ve antioksidan aktiviteleri karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Metanol ve aseton ekstraktları toplam fenolik içerik bakımından birbirine yakın değerler üretirken, sulu ekstrakt bu iki çözücünün belirgin biçimde gerisinde kaldı. Fosfomolibden yönteminde en yüksek antioksidan kapasite aseton ekstraktında belirlendi; bunu metanol izlerken sulu ekstrakt belirgin biçimde geride kaldı. DPPH testinde ise metanol ekstraktı her üç konsantrasyonda da en yüksek aktiviteyi sergiledi ve onu sırasıyla aseton ile sulu ekstrakt izledi. Bu bulgular *S. galatica*'nın kayda değer bir antioksidan potansiyele sahip olduğunu, ancak bu potansiyelin kullanılan analitik yönteme göre farklı biçimlerde ortaya çıkabildiğini ortaya koymaktadır.

Dikkat çeken bulgulardan biri, metanol ve aseton ekstraktlarının TPC bakımından neredeyse aynı sonuçları vermesidir; post-hoc analizde her iki çözücü aynı istatistiksel grupta (a) yer aldı. *Sideritis stricta*'da aseton ekstraktının metanol ekstraktına göre daha yüksek TPC sağladığı (Deveci ve ark. 2018), *S. albiflora* ve *S. leptoclada*'da ise bu iki çözücünün birbirine yakın geri kazanım değerleri ürettiği bildirilmiştir (Deveci ve ark. 2019). Bu örüntü, cinsin baskın fenolik bileşenleri olan

feniletanoid glikozitler, flavonoid glikozitler ve hidroksisinnamik asit türevlerinin polar organik çözücülerdeki yüksek çözünürlüğüyle de uyumludur (Romanucci ve ark. 2017; Żyżelewicz ve ark. 2020). Sulu ekstraktta gözlenen belirgin düşüş ise bazı aglikonların ve görece lipofilik fenolik türevlerin suda sınırlı çözünürlüğüyle açıklanabilir.

Metanol ekstraktının DPPH testinde gösterdiği üstünlük, *Sideritis* cinsi üzerine daha önce bildirilen verilerle uyumludur. Doğrudan *S. galatica*'yı ele alan bir çalışmada metanol ve sulu ekstraktların DPPH, ABTS (azino-bis-etilbenzotiyazolin sülfonik asit), FRAP (ferric reducing antioxidant power) ve CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity) testlerinde en güçlü performansı sergilediği gösterilmiş (Zengin ve ark. 2014); *S. brevibracteata*'da ise metanol ve aseton ekstraktlarının standart antioksidanlara yaklaşan düzeyde ve birbirine yakın yüksek DPPH inhibisyonu sergilediği bildirilmiştir (Sagır ve ark. 2017). Polar ekstraktların DPPH'te öne çıktığı, cinsin diğer türleri olan *S. niveotomentosa*, *S. perfoliata* ve *S. stricta* üzerinde yürütülen çalışmalarda da ortaya konmuştur (Deveci ve ark. 2018; Sarikurkcu ve ark. 2020; Şimşek Sezer ve Uysal 2021). Bu örüntü bir bütün olarak değerlendirildiğinde, mevcut çalışmada metanol ekstraktının DPPH aktivitesi bakımından öne çıkması, antioksidan etkinliğin polar organik ve sulu fraksiyonlarda yoğunlaştığını gösteren genel eğilimle açık biçimde örtüşmektedir.

Aseton ekstraktının fosfomolibden testinde en yüksek performansı göstermesi, *Sideritis* literatürü dikkate alındığında beklenmedik değildir; bu cinsin ait ekstraktların antioksidan kapasitesi kullanılan test sistemine göre değişmekte ve tüm yöntemlerde aynı çözücü üstünlük sağlamamaktadır. Nitekim *S. perfoliata*'da metanolik ve sulu ekstraktlar radikal süpürme ve indirgeme gücü testlerinde öne çıkarken β-karoten ağartma testinde çözücülerin etkinlik sıralaması değişmiştir (Sarikurkcu ve ark. 2020). *S. galatica*'da ise petrol eteri ve etil asetat ekstraktlarının toplam fenolik içerikleri daha düşük olmasına rağmen nitrik oksit süpürme, metal şelasyon ve β-karoten/linoleik asit sistemlerinde polar ekstraktlardan daha etkili olduğu gösterilmiştir (Zengin ve ark. 2014). Bu son bulgu, apolar fraksiyonlarda yer alan fenolik olmayan lipofilik antioksidanların bazı testlerde belirleyici katkı sağlayabileceğine işaret etmektedir. *S. stricta* ve *S. brevibracteata*'da aseton ekstraktlarının çeşitli antioksidan testlerde BHA ve α-tokoferol gibi standart bileşiklere yakın aktivite sergilediği raporu da bu görünümü desteklemektedir (Sagır ve ark. 2017; Deveci ve ark. 2018). Bu çerçevede, mevcut çalışmada DPPH ve fosfomolibden testlerinde gözlenen farklı sıralama, *Sideritis* cinsinde daha önce tanımlanmış yöntem temelli çözücü etkilerinin doğal bir yansıması olabileceği değerlendirilebilir.

Havuzlanmış ekstrakt örneği üzerinde yürütülen korelasyon ve regresyon analizleri fenolik içerik ile antioksidan göstergeler arasındaki ilişkiyi sayısallaştırdı: TPC ile TAC arasında güçlü bir doğrusal ilişki belirlenirken ($r=0.937$; $p<0.001$; $R^2=0.879$), TPC ile DPPH inhibisyonu arasındaki modeller anlamlı fakat görece zayıf düzeyde kaldı ve açıklayıcı güç artan konsantrasyonla kademeli olarak azaldı. Bu örüntü DPPH tepkisinin yalnızca fenolik miktarla değil ekstredeki bireysel radikal süpürücü bileşenlerin yapısal özellikleriyle de şekillendiğine işaret etmektedir. Nitekim Lamiaceae familyasına ilişkin çalışmalar *Sideritis scardica* ve *Thymus vulgaris* ekstraktlarında fenolik-antioksidan korelasyonunun

çözücü polaritesi ve ekstre bileşimine göre değiştiğini (Walasek-Janusz ve ark. 2025), Makedonya kökenli *Sideritis* türlerinde ise spesifik fenolik bileşiklerin toplam aktiviteye katkısının kütesel fenolik içerikten ayrı değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymuştur (Petreska ve ark. 2011). Moleküler düzeyde bir fenolün radikal süpürme potansiyeli, taşıdığı hidrojen-verici hidroksil gruplarının sayı ve konumuyla (Zhou ve ark. 2020), özellikle flavonoidlerde B-halkası üzerindeki katekol grubuyla belirlenmektedir (Jiménez-Moreno ve ark. 2019). Bununla birlikte, burada raporlanan korelasyonların üç çözücü grubunu kapsayan havuzlanmış örnek üzerinden hesaplandığı göz ardı edilmemelidir; gözlenen ilişkiler grup içi değişkenlikten çok gruplar arası değişkenliği yansıtır olabilir.

DPPH radikal süpürme aktivitesinin üç konsantrasyonda ölçülmesi, çözücü etkilerinin konsantrasyonla nasıl etkilendiğini incelemeye olanak tanıdı. Çözücü×konsantrasyon etkileşiminin anlamlı bulunmaması, ekstraksiyon verimindeki çözücü bağımlı farklılıkların konsantrasyondan bağımsız, yapısal bir özellik olarak konumuna işaret etmektedir. Hiçbir ekstraktın %50 inhibisyon eşiğine ulaşmaması, reaksiyonun test aralığında doygunluğa ulaşmadığını ve çözücüye bağlı farklılıkların radikal süpürme reaksiyonunun doğrusal yanıt bölgesinde gözlemlendiğini düşündürmektedir. Benzer bir çözücü bağımlı hiyerarşi diğer *Sideritis* türleri için de belgelenmiştir: *S. stricta*'da aseton ve metanol ekstraktları DPPH ve ABTS testlerinde sulu ekstrakta kıyasla belirgin biçimde daha düşük IC₅₀ değerleri üretmiş (Deveci ve ark. 2018); *S. albiflora* ve *S. leptoclada*'da ise aseton ve metanol fraksiyonları en etkili radikal süpürücüler olarak belirlenmiş, sulu ekstraktlar test türünden bağımsız olarak bunların gerisinde kalmıştır (Deveci ve ark. 2019).

Mevcut bulgular bir bütün olarak değerlendirildiğinde fenolik içerik ile antioksidan etkinlik arasında genel bir paralellığe işaret etmektedir: sulu ekstrakt hem en düşük fenolik içeriğe hem de her iki testteki en zayıf performansa sahip olmakla bu ilişkinin en belirgin göstergesini sunmaktadır. Yüksek toplam fenolik ve flavonoid içeriğine sahip ekstraktların daha güçlü antioksidan aktivite sergilediği literatürde sıklıkla bildirilmiştir (Petreska ve ark. 2011; Şimşek Sezer ve Uysal 2021; Öztürk Sarıkaya ve Zehiroğlu 2023). Bununla birlikte aseton ekstraktının fosfomolibden testinde metanol ekstraktını geride bırakması, antioksidan etkinliğin yalnızca toplam fenolik düzeyle açıklanamayacağına ve ekstrakta yer alan farklı sekonder metabolit gruplarının da sonuca katkı sağladığına işaret etmektedir; *Sideritis* cinsi feniletanoid glikozitler, flavonoid asetilglikozitler, hidroksisinnamik asit türevleri ve çeşitli terpenoitler bakımından zengindir (Romanucci ve ark. 2017; Żyżelewicz ve ark. 2020).

Bu yorum *S. galatica*'nın raporlanmış fitokimyasal verileriyle de desteklenmektedir. Zengin ve ark. (2014) bu türün farklı çözücü ekstraktlarında benzoik asit, klorojenik asit, kaempferol, (-) -epikateşin ve apigenin gibi bileşenleri tespit etmiş; hesperidinin yalnızca metanol ekstraktında bulunduğunu göstermiştir. Dişli ve ark. (2002) ise aynı türün petrol eteri ekstraktından yeni bir diterpen (galaticat) izole etmiştir. Bu veriler bir arada değerlendirildiğinde, gözlenen antioksidan aktivitenin tek bir bileşiğe atfedilemeyeceği ve polar ekstraktlarda fenolik bileşiklerin, apolar fraksiyonlarda ise terpenoidlerin baskın olduğu zengin bir fitokimyasal bileşimle ilişkili olduğu anlaşılmaktadır.

Beş antioksidan değişkenin birlikte değerlendirildiği çok değişkenli analizler, parametre-düzeyindeki bulguları bütünleşik bir çerçevede desteklemiştir. PCA'da metanol ve aseton ekstraktları negatif PC1 bölgesinde birbirine yakın kümelenirken, sulu ekstraktlar pozitif PC1 bölgesinde ayrı bir alan oluşturdu. Bu görsel ayrışma PERMANOVA ile istatistiksel olarak doğrulandı; çözücü türü çok değişkenli yanıt uzayındaki varyansın büyük kısmını açıkladı ($R^2=0.942$; $p=0.010$). Sonuç, metanol ve aseton ekstraktlarının antioksidan profil bakımından benzer, sulu ekstraktın ise belirgin biçimde farklı olduğunu çok değişkenli düzeyde ortaya koymaktadır. Bununla birlikte sınırlı örneklem büyüklüğü ($n=9$) ve KMO değerinin eşikte kalması (0.586), çok değişkenli sonuçların keşifsel bir perspektiften yorumlanması gerektiğine işaret etmektedir. Deneyel tasarımı her çözücü grubu için kullanılan üç bağımsız tekrar sayısı, *Sideritis* cinsi üzerine yürütülen benzer in vitro antioksidan çalışmalarda yerleşik uygulamaya dayalı olarak belirlenmiştir (Sagır ve ark. 2017; Deveci ve ark. 2018; Şimşek Sezer ve Uysal 2021). Gelecek çalışmalarda artırılmış tekrar sayılarının özellikle etkileşim etkileri gibi daha ince farklılıkların değerlendirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Sideritis türleri arasında ya da tek bir tür içinde farklı çalışmalar arasında gözlenen değişkenlik yalnızca çözücü seçimiyle açıklanamaz; mevsim, rakım ve yetiştirme koşulları hem toplam fenolik içerik hem de antioksidan kapasite için belirleyici etkenler olarak raporlanmış, ekstraksiyon tekniğinin de biyoaktif bileşik verimini doğrudan etkilediği gösterilmiştir (Chrysargyris ve ark. 2021; Mróz ve ark. 2023). Geleneksel hazırlık yöntemleri de profili şekillendirmekte; infüzyon ve dekoksasyon arasında fenolik içerik ve antioksidan sonuçlar bakımından anlamlı farklar bildirilmiştir (Çarıkçı 2020). Bu çalışmada ekstraktlar çözücü ekstraksiyonuyla hazırlandı. Mevcut bulguların yorumlanmasında bu nedenle yalnızca türler arası farklar değil, bitki materyalinin elde edilme, hazırlanma ve ekstraksiyon koşulları da dikkate alınmalıdır.

Mevcut çalışma *S. galatica*'nın antioksidan profiline odaklı bir katkı sunmaktadır. Zengin ve ark. (2014) bu türün dört çözücü ekstraktıyla hazırlanan örnekler üzerinde kapsamlı bir antioksidan ve enzim inhibisyonu taraması gerçekleştirmiş; diyet dizisi dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-DAD) ile 18 fenolik bileşik tanımlamıştır. Bu arka plan üzerine üç spesifik genişleme getirilmektedir. Birincisi, Zengin ve ark. (2014)'ün çözücü setinde yer almayan aseton, mevcut çalışmada metanol ve suya karşı doğrudan karşılaştırmaya alındı. İkincisi, DPPH aktivitesi üç farklı konsantrasyonda ve tam faktöriyel tasarım içinde ölçülerek çözücü×konsantrasyon etkileşimi sınandı. Üçüncüsü, veriler tek noktalı karşılaştırmalar yerine iki yönlü ANOVA, korelasyon-regresyon ve çok değişkenli yöntemlerle (PCA, PERMANOVA) yorumlandı.

Sonuç olarak bu çalışma, *S. galatica*'nın toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstraktların antioksidan profilinin kullanılan çözücüye bağlı olarak belirgin şekilde değiştiğini ortaya koymaktadır. Metanol ve aseton ekstraktlarının, hem toplam fenolik içerik hem de antioksidan aktivite parametreleri açısından sulu ekstrakta kıyasla anlamlı derecede daha yüksek değerlere sahip olduğu belirlendi. Bu iki organik çözücünün ise birbirine oldukça yakın sonuçlar verdiği görüldü. Çok değişkenli istatistiksel analizler, gözlenen bu farklılaşmayı destekleyerek çözücü seçiminin antioksidan özellikler üzerindeki belirleyici etkisini açık biçimde ortaya koydu. Elde edilen bulgular, *S. galatica*'nın özellikle metanol ve aseton ekstraktlarının potansiyel doğal antioksidan

kaynaklar olarak değerlendirilebileceğini düşündürmekte ve türün ileri düzey fitokimyasal ile fonksiyonel analizlerle daha kapsamlı biçimde incelenmesine temel oluşturmaktadır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

TEŞEKKÜR VE BİLGİLENDİRME

Bu çalışmanın ön bulguları, 2. Uluslararası Hayvansal Gıdalar Kongresi'nde (8-11 Kasım 2018, Kıbrıs) sözlü bildiri olarak sunulmuş ve özet halinde yayımlanmıştır.

YAZAR KATKILARI

Fikir/Kavram: DAA
Denetleme/Danışmanlık: DAA
Veri Toplama ve/veya İşleme: DAA
Analiz ve/veya Yorum: DAA
Makalenin Yazımı: DAA
Eleştirel İnceleme: DAA

KAYNAKLAR

- Acaröz U, İnce S, Kara R, Gürler Z, Soylu A (2021). Investigation of the antimicrobial effect of endemic *Sideritis galatica* plant. *Vet Hekim Derg*, 92(1), 1-6.
- Ainsworth EA, Gillespie KM (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat Protoc*, 2(4), 875-877.
- Altun M (2023). Phytochemical components, antioxidant, antibacterial, and synergistic effects of endemic *Sideritis trojana* extract in combination with antibiotics on human pathogens. *Sakarya Univ J Sci*, 27(5), 1008-1018.
- Aneva I, Zhelev P, Kozuharova E ve ark. (2019). Genus *Sideritis*, section *Empedoclia* in southeastern Europe and Turkey—studies in ethnopharmacology and recent progress of biological activities. *Daru*, 27(1), 407-421.
- Blois MS (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- Bouymajane A, Filali FR, El Majdoub YO ve ark. (2022). Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities of extracts from aerial parts of *Thymus zygis* subsp. *gracilis*, *Mentha suaveolens* and *Sideritis incana* from Morocco. *Chem Biodivers*, 19(3), e202101018.
- Can Gunduz O, Acaroz U, Demirel HH (2025). Polydatin attenuates sodium fluoride-induced oxidative and inflammatory damage in rats. *Istanus JABS*, 1(1), e5.
- Çarıkçı S (2020). Antioxidant and anticholinesterase properties of *Sideritis perfoliata* subsp. *athoa* (Papan. & Kokkini) Baden and *Sideritis trojana* Bornm. teas from Mount Ida-Turkey and their phenolic characterization by LC-MS/MS. *J Turk Chem Soc A Chem*, 7(2), 617-634.
- Chrysargyris A, Evangelides E, Tzortzakakis N (2021). Seasonal variation of antioxidant capacity, phenols, minerals and essential oil components of sage, spearmint and *Sideritis* plants grown at different altitudes. *Agronomy*, 11(9), 1766.
- Deveci E, Tel-Çayan G, Duru ME (2018). Phenolic profile, antioxidant, anticholinesterase, and anti-tyrosinase activities of the various extracts of *Ferula elaeochytris* and *Sideritis stricta*. *Int J Food Prop*, 21(1), 771-783.
- Deveci E, Tel-Çayan G, Duru ME, Öztürk M (2019). Phytochemical contents, antioxidant effects, and inhibitory activities of key enzymes associated with Alzheimer's disease, ulcer, and skin disorders of *Sideritis albiflora* and *Sideritis leptoclada*. *J Food Biochem*, 43(12), e13078.
- Dişli A, Yıldırım Y, Yaşar A (2002). Galaticat, a new diterpene from *Sideritis galatica*. *Ankara Univ Eczacılık Fak Derg*, 31(2), 83-89.
- Jamshidi-kia F, Wibowo JP, Elachouri M ve ark. (2020). Battle between plants as antioxidants with free radicals in human body. *J Herbmed Pharmacol*, 9(3), 191-199.
- Jiménez-Moreno N, Volpe F, Moler JA, Esparza I, Ancin-Azpilicueta C (2019). Impact of extraction conditions on the phenolic composition and antioxidant capacity of grape stem extracts. *Antioxidants*, 8(12), 597.
- Knörle R (2012). Extracts of *Sideritis scardica* as triple monoamine reuptake inhibitors. *J Neural Transm*, 119(12), 1477-1482.
- Korkmaz K, Kara SM, Özkutlu F, Akgün M, Şenkal BC (2017). Profile of heavy metal and nutrient elements in some *Sideritis* species. *Indian J Pharm Educ Res*, 51(3), 209-212.
- Mróz M, Malinowska-Pańczyk E, Bartoszek A, Kusznierevicz B (2023). Comparative study on assisted solvent extraction techniques for the extraction of biologically active compounds from *Sideritis raeseri* and *Sideritis scardica*. *Molecules*, 28(10), 4207.
- Öztürk Sarıkaya SB, Zehiroğlu C (2023). Endemic mountain tea (*Sideritis dichotoma* Huter): antioxidant and antibacterial activities, mineral content by ICP-MS and phytochemical content by LCHR-MS. *Chem Biodivers*, 20(12), e202301453.
- Petreska J, Stefova M, Ferreres F ve ark. (2011). Dietary burden of phenolics per serving of "mountain tea" (*Sideritis*) from Macedonia and correlation to antioxidant activity. *Nat Prod Commun*, 6(9), 1305-1314.
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*, 269(2), 337-341.
- R Core Team (2025). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Romanucci V, Di Fabio G, D'Alonzo D ve ark. (2017). Traditional uses, chemical composition and biological activities of *Sideritis raeseri* Boiss. & Heldr. *J Sci Food Agric*, 97(2), 373-383.
- Sagir ZO, Carikci S, Kilic T, Goren AC (2017). Metabolic profile and biological activity of *Sideritis brevibracteata* P. H. Davis endemic to Turkey. *Int J Food Prop*, 20(12), 2994-3005.
- Samuel E, Ajisope E, Olabintan O ve ark. (2026). Tridax procumbens leaf extract mitigated vincristine-induced organ pathology and oxidative imbalances in Wistar rats. *Istanus JABS*, 2(1), e2.
- Sarikurkcü C, Locatelli M, Mocan A, Zengin G, Kirkan B (2020). Phenolic profile and bioactivities of *Sideritis perfoliata* L.: the plant, its most active extract, and its broad biological properties. *Front Pharmacol*, 10, 1642.
- Şimşek Sezer EN, Uysal T (2021). Phytochemical analysis, antioxidant and anticancer potential of *Sideritis niveotomentosa*: endemic wild species of Turkey. *Molecules*, 26(9), 2420.
- Walasek-Janusz M, Papliński R, Mysiak B, Nurzyńska-Wierdak R (2025). Phenolic profile and antioxidant activity of extracts from aerial parts of *Thymus vulgaris* L. and *Sideritis scardica* Griseb. *Appl Sci*, 15(7), 3842.
- Zengin G, Sarikurkcü C, Aktumsek A, Ceylan R (2014). *Sideritis galatica* Bornm.: a source of multifunctional agents for the management of oxidative damage, Alzheimer's and diabetes mellitus. *J Funct Foods*, 11, 538-547.
- Zhou J, Yang Q, Zhu X ve ark. (2020). Antioxidant activities of *Clerodendrum cyrtophyllum* Turcz leaf extracts and their major components. *PLoS One*, 15(6), e0234435.
- Żyżelewicz D, Kulbat-Warycha K, Oracz J, Żyżelewicz K (2020). Polyphenols and other bioactive compounds of *Sideritis* plants and their potential biological activity. *Molecules*, 25(16), 3763.



Perissodactyla (Tek Toynaklılar) Takımının Evrimi, Morfolojisi ve Ekolojisi

Yavuzkan PAKSOY^{1,*} Duygu ARSLAN² ¹ Çukurova Üniversitesi, Ceyhan Veteriner Fakültesi, Zootehni Anabilim Dalı, 01250, Adana, Türkiye² Alfa Vet Veteriner Hekim Muayenehanesi, 31200, Hatay, Türkiye

Geliş Tarihi: 07.04.2026

Kabul Tarihi: 03.06.2026

ÖZ

Memelilerin evriminde kritik bir öneme sahip olan tek toynaklılar (Perissodactyla), evrimsel olarak tek bir toynak (tırnak) yapısına sahip, bazılarının hızlı koşma yeteneği gelişmiş, otobur memeliler grubunu ifade eder. Perissodactyla takımı; atlar/eşekler ve zebrealar (Equidae), gergedanlar (Rhinocerotidae) ve tapirleri (Tapiridae) içerir. Anatomik olarak incelendiğinde, bu hayvanların en belirgin özelliği üçüncü parmaklarının baskın hale gelerek toynak yapısını oluşturmalarıdır. Tek toynaklıların sindirim sistemi, geviş getirenlerden farklı olarak tek midelidir ancak oldukça gelişmiş bir bağırsak fermantasyonu (Monogastrik Sekum Fermenterleri) sistemi vardır. Bu sayede lifli bitkileri sindirme yetenekleri yüksektir. Ancak aynı zamanda bu özellik, sindirim sistemlerini kolik gibi hastalıklara karşı hassas hâle getirir. Davranışsal olarak sürü hayvanı olan tek toynaklılar, çevresel tehditlere karşı oldukça tetikte ve refleksif tepki verme eğilimindedir. Katırlar, at ve eşeğin melezi olarak, güçlü ve zeki özellikleriyle tanınır. Veteriner hekimlik açısından tek toynaklılar, nal bakımı, laminitis, ortopedik bozukluklar, diş problemleri ve parazit kontrolü gibi özel ilgi gerektiren konuları barındırır. Ayrıca spor ve yarış atlarının performans yönetimi, bu türlerin modern veterinerlikteki önemini artırmaktadır. Sonuç olarak, tek toynaklılar hem biyolojik özellikleri hem de insanlık tarihindeki işlevsel rolleriyle dikkate değer, multidisipliner bir çalışma alanı sunar. Bu çalışma, Perissodactyla'nın atasal morfolojisini, üyelerini ve üyelerin karakteristik özelliklerini detaylı bir literatür araştırması ile ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: At, Irk, Tek toynaklılar, Zebra.

ABSTRACT

The Evolution, Morphology, and Ecology of The Perissodactyla (Single-Toed Ungulates) Order

Perissodactyla, which play a critical role in the evolution of mammals, refer to a group of herbivorous mammals that have evolved to have a single hoof structure and some of them are capable of running fast. The Perissodactyla order includes horses/donkeys and zebras (Equidae), rhinoceroses (Rhinocerotidae), and tapirs (Tapiridae). Anatomically, the most distinctive feature of these animals is that their third toe has become dominant, forming the hoof structure. The digestive system of odd-toed ungulates is monogastric, unlike ruminants, but they have a highly developed intestinal fermentation system (Monogastric Cecal Fermenters). This gives them a high capacity to digest fibrous plants. However, this feature also makes their digestive systems susceptible to diseases such as colic. Behaviorally, perissodactylates are herd animals and tend to be highly alert to environmental threats and reflexive in their responses. Mules, as a cross between horse and donkey, are known for their strength and intelligence. From a veterinary perspective, single-hoofed animals require special attention to issues such as hoof care, laminitis, orthopedic disorders, dental problems, and parasite control. In addition, the performance management of sport and race horses increases the importance of these species in modern veterinary medicine. In conclusion, ungulates offer a noteworthy, multidisciplinary field of study due to both their biological characteristics and their functional roles in human history. This study details the ancestral morphology of Perissodactyla, its members, and the characteristic features of its members through a thorough literature review.

Keywords: Breed, Horse, Monodactyls, Zebra.

GİRİŞ

Perissodactyla'nın Kökeni

Tek toynaklılar tek bir toynak yapısına sahip, otobur

memeliler grubundadır. Perissodactyla takımı; atlar/eşekler (Equidae), gergedanlar (Rhinocerotidae) ve tapirleri (Tapiridae) içerir. Perissodactyla takımının (gergedanlar, tapirler ve atlar) evrimi, kapsamlı fosil



kayıtları nedeniyle iyi incelenmiştir (Steiner ve Ryder 2011).

Âlem	: Hayvanlar
Bölüm	: Chordata
Alt Bölüm	: Vertebrata-omurgalılar
Sınıf	: Mammalia-memeliler
Alt Sınıf	: Eutheria-plasentalılar
Takım	: Ungulata-toynaklılar
Alt Takım	: Perissodactyla-tek toynaklılar
Familiya	: Equidae-atgiller
Cins	: Equus-at
Tür	: E. caballus-at
	: E. asinus-eşek
	: E. zebra-zebra

Takım Perissodactyla - Tek toynaklılar

Alt takım Hippomorpha

Familiya Equidae - Atgiller: Atlar ve benzerleri, tek cins içinde 9 tür

- Equus caballus-At
- Equus gmelini-Tarpan (Avrupa Yaban Atı)
- Equus przewalskii-Przewalski atı,
- Equus asinus-Afrika yaban eşiği,
- Equus hemionus-Asya yaban eşiği,
- Equus burchellii-Ova zebrası,
- Equus zebra-Dağ zebrası,
- Equus grevyi-Grevy zebrası,

Alt takım Ceratomorpha

Familiya Tapiridae - Tapirgiller: Tapirler, tek cins içinde 4 tür

- Tapirus terrestris-Brezilya tapiri,
- Tapirus pinchaque-Dağ tapiri,
- Tapirus bairdii-Baird tapiri,
- Tapirus indicus-Hint tapiri

Familiya Rhinocerotidae-Gergedangiller: Gergedanlar, 4 cins içinde 5 tür

- Diceros bicornis-Kara gergedan,
- Ceratotherium simum-Beyaz gergedan,
- Rhinoceros unicornis-Hint gergedanı,
- Rhinoceros sondaicus-Java gergedanı,
- Dicerorhinus sumatrensis-Sumatra gergedanı (Tougard ve ark. 2001; Wilson ve Reeder 2005; Cozzuol ve ark. 2013; Sikandar 2020).

Tek toynaklılar takımının günümüzde yaşayan üyeleri iki alt takımda sınıflandırılır:

Hippomorpha; her ayağında tek toynağı olan, uzun bacaklı, hızlı koşan hayvanlardan oluşur. Günümüzde soyunu sürdüren tek familiya atgiller (Equidae) ve bu familiya içindeki tek cins olan *Equus*'tur. Bu cins içinde at, zebra, eşek ve diğer türler bulunur. İşlevsel olarak tek toynaklılar bulunur. Diğer parmaklar (2. ve 4.) tamamen kaybolmamıştır, ancak körelmiş splint kemikleri (rudimenter kemikler) olarak varlığını sürdürmüştür. 3. parmak baskın hale gelmiş ve diğerleri körelmiştir. Toynak yapısı bu şekilde oluşmuştur.

Ceratomorpha; birkaç işlevsel toynağı olan ve Hippomorpha türlerinden daha ağır ve daha yavaş hareket

eden tek toynaklıların oluşturduğu alt takımdır. Bu alt takımın içinde soyunu sürdüren iki familiya bulunur: Tapirgiller (Tapiridae) ve Gergedangiller (Rhinocerotidae). Akkraba olan bu türlerin ağız yapısı ve morfolojik yapılarında önemli farklılıklar bulunmaktadır. Tapirin üst dudağı yaprak ve dalları ağızına götürebilmek için küçük hortum şeklindedir. Gergedanların ise rahat otlayabilmesi için kare şeklinde ağızları vardır. Atlar hareketli ve kaslı dudaklara sahiptir, kesici dişleri ile otları koparak beslenirler (Steiner ve Ryder 2011).

Tek Toynaklılarda Sindirim Sistemi

Tek toynaklıların sindirim sistemi son 40 milyon yıl dikkate alınarak tatarlar arasında türler karşılaştırılarak ele alınmaktadır.

Seenozoik dönemde, ön mide fermentasyonu yapan Artiodactyla'lar güçlü bir şekilde radyasyon yayıyordu; bu durum, arka bağırsak fermentasyonu yapan Artiodactyla (Suidae) ve Perissodactyla'ların (Equidae, Rhinocerotidae, Tapiridae) koşullarının aksinedir. Pecora'lar, geviş getirme süreciyle sindirim ürünlerinin parçacık boyutunu küçülttikleri ve böylece sindirim ürünlerinin geçişini artırdıkları için özellikle başarılı ön mide fermentasyoncuları olmuştur. Bu, memelinin yalnızca mikrobiyal aktivitenin metabolik ürünlerini (çoğunlukla uçucu yağ asitleri) değil, aynı zamanda toynaklılar tarafından otoenzimatik olarak sindirilebilen besin maddelerinin daha yüksek bir yüzdesini de elde edebilmesi nedeniyle avantajlıdır (Langer 1987). Uzun ve katlanmış kolon yapısı tek toynaklılarda kolik görülme ihtimalini artırır (Rose ve Hodgson 2007).

Atgiller, çok çeşitli bitki türleri ve bitki parçaları tüketen otçullardır. Tek mideli olan bu canlıların oldukça gelişmiş bir bağırsak fermentasyonu (hindgut fermentation) sistemi vardır. Anatomik olarak: Monogastrik Sekum Fermenterleri (Monogastric Cecal Fermenters) olarak anılırlar. Anatomi, fizyoloji ve mikrobiyolojilerinde (bilimsel araştırma alanı olarak hala emekleme aşamasında olan) çeşitli kalitedeki yemleri kesmelerine, çiğnemelerine ve sindirmelerine yardımcı olan adaptasyonlara sahiptirler. Atgilleri diğer türlerden ayıran temel anatomik yapılar, hipsodont ve selenodont dişleri (yemleri ince bir şekilde çiğneyebilen) ve arka bağırsaklarıdır (kör bağırsak ve kalın bağırsak). Genel olarak atgiller, besinlerinin çoğunu hücrenin çözünür kısımlarından ve hücre duvarının kolay sindirilen kısımlarından elde edebiliyor gibi görünmektedir. Ayrıca (geviş getiren hayvanlar gibi) sindirim sistemindeki yüksek hücre duvarı ve büyük parçacıklar tarafından kısıtlanmazlar, bu da daha fazla alım için yolu açar. Bu durum, atgillerin geviş getiren hayvanlardan farklı olarak yüksek yem alımı ve hızlı gastrointestinal geçiş ile karakterize edilen bir sindirim stratejisine sahip olduklarını göstermektedir. Bazı yeni çalışmalar, tükürükteki prolin açısından zengin protein eksikliğinin zebraların tanen açısından zengin bir diyet (yani çalılar ve ağaçlardan) tüketme yeteneğini sınırladığını, ancak kulanlar ve kıangların çok fazla ot ve bitki tükettiğini ileri sürmektedir (Andrews 2015; Gordon ve Prins 2023). Yiyecek arama ve sindirim konusundaki bilgimizin çoğu evcil atlardan gelmektedir, bu da vahşi doğada atgillerin anatomi, fizyoloji ve mikrobiyoloji çeşitliliği hakkında hala öğrenilecek çok şey olduğu anlamına gelir. Son mikrobiyom çalışmaları, aynı bölgede yaşayan atgiller arasında ne kadar farklı olabileceğini göstermektedir ve bu da tüm atgillerin eşit olmayabileceğini olası kılmaktadır. Sonuç olarak, atgillerin geviş getiren hayvanlara göre çok düşük ve çok yüksek kaliteli yemleri tüketmeye daha iyi

adapte oldukları yönündeki uzun süredir devam eden görüş hala geçerli olabilir, ancak bu büyük ölçüde evcil atlar ile koyunlar ve sığırlar üzerinde yapılan çalışmalara dayanmaktadır. Giderek daha belirgin hale gelen şey, atgillerin yiyecek arama ve sindirim stratejilerinin geviş getiren hayvanlardan farklı olduğu ve onlardan daha aşağı olmadığıdır (Gordon ve Prins 2023).

Evrimlerinin erken dönemlerinde sindirim stratejisi olarak arka bağırsak fermentasyonunu benimsemeleri, atgilleri yüksek lif ve düşük protein içeriğiyle karakterize kaba otlaklarda beslenmeye sınırlamıştır. Bu tür bitki örtüsünün arka bağırsak fermentasyonu, yüksek oranda gönüllü besin alımı ve sindirim sıvısının geçişiyle birleştiğinde, atgillere yüksek lifli otlarda sindirim verimliliği açısından benzer vücut boyutuna sahip geviş getirenlere göre bir avantaj sağlamıştır. Bu sindirim stratejisi, yabani atgillerin günümüzdeki ekolojik nişini açıklamaktadır. Lifli bitki örtüsünün mikrobiyal fermentasyonu için gereken büyük su hacmi, dehidrasyon dönemlerinde kalan vücut sıvı havuzları için potansiyel bir sıvı kaynağı görevi görebilecek bir sıvı rezervuarı oluşturur (Cozzuol ve ark. 2013). Tek toynaklı hayvanlar geviş getiren hayvanların aksine selüloz gibi lifli bitkisel maddeleri sindirmek için midelerini değil, sindirim sisteminin son kısımlarını kullanırlar. Besinler midede mikrobiyal fermentasyona uğramadan, doğrudan asit ve enzimlerle kimyasal olarak parçalanır. Tapirlerin lifi sindirme yeteneği atlara oranla daha azdır. Gergedan ise gövde büyüklüğü nedeniyle daha çok besin tüketir ve kolonları aşırı genişlemiştir (Openlearn 2026).

AT

Atın Genel Özellikleri

Atlar (*Equus caballus*), tek toynaklı memeliler sınıfına ait, tarih boyunca farklı amaçlarla yetiştirilen hayvanlardır. Hem evcil hayvanlar olarak hem de tarım, savaş, spor ve ulaşım gibi alanlarda önemli roller üstlenmişlerdir. Günümüzde ise özellikle spor, terapi ve binicilik faaliyetlerinde değerli bir yere sahiptirler (Kocakaya ve ark. 2026).

Biyolojik olarak atlar, Perissodactyla takımında yer alan tek toynaklılardır. Vücutları zarif ama dayanıklıdır; uzun bacakları ve güçlü kas yapıları sayesinde hızlı koşmaya son derece elverişlidirler. Bu da onları hem yırtıcılardan korunmak hem de uzun mesafeleri kısa sürede katetmek açısından avantajlı kılar (Yıldırım 2019).

Ortalama bir at, cinsine bağlı olarak 400 ila 600 kilogram arasında değişen bir ağırlığa sahip olabilir. Cidago yüksekliği ise genellikle 140 ila 180 santimetre arasında seyreder. Bununla birlikte, pony olarak adlandırılan küçük ırklar bu değerlerin altında, soğukkanlı iş atları ise üzerinde ölçümlenebilir. Atların vücut sıcaklığı ortalama 37,5–38,5 °C arasında değişirken, istirahat halindeki kalp atım sayısı dakikada 28 ila 44 arasındadır. Solunum sayısı da dakikada 8 ila 16'dır. Bu fizyolojik değerler, atın yaşına, stres düzeyine ve egzersiz durumuna göre değişiklik gösterebilir (Kocakaya ve ark. 2026).

Sindirim sistemleri tek midelidir ancak büyük ve kompleks bir sekuma sahiptirler. Selüloz gibi lifli yapıları mikrobiyal fermentasyonla sindirmelerine olanak tanır. Ancak sindirim sistemleri oldukça hassastır. Ani yem değişiklikleri, fazla tahıl tüketimi veya hijyenik olmayan yemler ciddi sindirim problemlerine, özellikle de kolik adı verilen hayati risk taşıyan durumlara neden olabilir (Costa 2017; Paksoy ve Koluman 2025).

Atlar sosyal ve zeki canlılardır. Sürü içgüdüleriyle hareket eder, hiyerarşik bir yapı içinde yaşamayı tercih ederler. Tehlike karşısında verdikleri ilk tepki genellikle kaçmaktır. Aynı zamanda öğrenmeye ve eğitime oldukça açıktırlar. Sesli komutlara ve vücut diline duyarlıdırlar. Pozitif pekiştirmeye kısa sürede alışkanlık kazanabilirler. Ancak olumsuz deneyimleri de uzun süre hafızalarında tutarlar; bu yüzden eğitim sürecinde sabır ve tutarlılık büyük önem taşır.

Dişi atlara "kısırak", erkek atlara "aygır" denir. Kısırlaştırılmış erkek atlara ise "ruşen" veya "iğdiş" adı verilir. Yavrular doğduklarında "tay" olarak adlandırılır ve taylar doğumdan sonraki ilk yıl boyunca büyüme ve sosyalleşme açısından kritik bir dönem geçirir. Atların gebelik süresi ortalama 11 ay civarındadır. Genellikle tek yavru doğururlar, ikiz doğum çok nadirdir ve çoğunlukla ciddi sağlık riskleri taşır (Yılmaz ve Özbilen 2011).

Atlar lacertus fibrosus tendonu sayesinde ayakta dinlenirler. Atlarda safra kesesi yoktur. Anatomik olarak dikkat çekici diğer bir özellikleri, köprücük kemiğine sahip olmamalarıdır. Bu durum, ön ayaklarının gövdeye doğrudan kas ve bağ dokularıyla asılı kalmasını sağlar ve koşarken enerji aktarımını verimli hale getirir. Toynak yapısı da karmaşıktır. Lamina adı verilen yapılar sayesinde toynak kapsülü kemik yapı ile birleşir ve atın ağırlığını dağıtarak hareket etmesini sağlar. Ancak bu yapı aynı zamanda hassastır ve özellikle "laminitis" gibi hastalıklarda ciddi sorunlara yol açabilir (Paksoy ve Arslan 2023).

Veteriner hekimlik açısından atların düzenli olarak aşılanması, iç ve dış parazitlere karşı ilaçlanması, toynak bakımlarının yapılması ve diş sağlıklarının korunması büyük önem taşır. Özellikle at dişleri sürekli büyüme eğilimindedir. Hypsodont diş yapısı, atların yüksek miktarda silis ve lif içeren sert otları tüketirken dişlerinin tamamen erimesini önleyen, evrimsel bir adaptasyondur. Bu mekanizma sürekli aşınma ile kompansatuvar (dengeleyici) sürme prensibiyle çalışır. Bu nedenle yılda en az bir kez diş törpüsü (floating) uygulanmalıdır. Ayrıca nal bakımı ve toynak düzeltmeleri için düzenli olarak nalbant kontrolü gereklidir.

Atlar ırklarına ve eğitim durumlarına göre çok çeşitli alanlarda kullanılabilir. Yarış atları (örneğin İngiliz veya Arap atları) hızları ve çeviklikleriyle bilinirken, Belçika veya Clydesdale gibi soğukkanlı atlar daha çok çekim işlerinde kullanılır. Haflinger ve Quarter Horse gibi ırklar ise binicilik ve terapi alanlarında tercih edilir (Doğan ve Kapçak 2023).

At Irkları

Atın köpek, koyun, keçi ve sığırdan sonra MÖ 3000'li yıllarda evcilleştirildiği kabul edilmektedir. Evcil atlara üç yabani at (*Equus tarpan*, *Equus przewalskii*, *Equus robustus*) köken oluşturmuştur (Paksoy 2016). At ırkları, temel olarak üç ana gruba ayrılır: sıcakkanlı, soğukkanlı ve yarımkanlı (melez) ırklar. Bu sınıflandırma, hayvanın fizyolojik yapısı, mizacı ve kullanım amacıyla doğrudan ilişkilidir. Sıcakkanlı atlar genellikle hızlı, çevik ve narin yapıya sahiptir; soğukkanlı atlar iri, dayanıklı ve ağır işlere uygun yapıda olur. Yarımkanlı ırklar ise bu iki grubun melezlenmesiyle ortaya çıkmış olup, dengeli bir fiziksel ve karakteristik yapıya sahiptir.

Dünyanın en tanınmış sıcakkanlı at ırklarından biri olan Arap atı, Orta Doğu kökenlidir ve dayanıklılığı, zekası ve asil duruşuyla bilinir. Narin kemik yapısı ve yüksek kuyruğu, bu ırkın ayırt edici özelliklerindendir. Özellikle uzun mesafe dayanıklılık yarışlarında (endurance) üstün başarı gösterir. Aynı şekilde, İngiltere kökenli İngiliz

(Thoroughbred) atı da sıcakkanlılar arasında yer alır ve dünyanın en hızlı yarış atı olarak kabul edilir. Bu atlar, yarış pistlerinde kullanılan en popüler ırklar arasında bulunur (Yılmaz ve Özbilen 2011).

Soğukkanlı atlar arasında ise Clydesdale, Shire ve Belçika Atı gibi dev yapılı ırklar öne çıkmaktadır. Bu atlar genellikle tarım işlerinde, yük taşımacılığında ve ormancılıkta kullanılır. Güçlü kemik yapısı, geniş gövdesi ve sakın mizacı sayesinde ağır işleri yorulmadan yapabilirler. Soğukkanlı atlar yavaş hareket ederler ama uzun süre dayanabilirler. Aynı zamanda eğitimleri kolaydır çünkü itaatkâr ve sakın hayvanlardır.

Yarımkanlı ya da melez atlar arasında ise Hanoverian, Trakehner, Oldenburg, Dutch Warmblood gibi ırklar yer alır. Bu ırklar, sıcak ve soğukkanlı atların seçici çifletirilmesiyle elde edilmiş olup, genellikle spor atı olarak değerlendirilir. Atlama, dresaj ve üç günlük yarış gibi binicilik sporlarında başarı gösterirler. Hem güç hem çeviklik gerektiren branşlar için ideal yapıdadırlar (Zaneb ve ark. 2013).

Binicilikte sıkça rastlanan bir başka ırk olan Quarter Horse, adını kısa mesafede (çeyrek mil) çok hızlı koşmasından alır. Amerika kökenli bu ırk, özellikle kovboy kültüründe, sürü yönetiminde ve western sporlarında önemli bir yere sahiptir. Kas yapısı güçlü, çevik ve komutlara hızlı cevap verebilen bir atır.

Friesian atı, Hollanda kökenlidir ve zarif görünümüyle özellikle gösteri, dresaj ve çekim arabalarında tercih edilir. Uzun, dalgalı yele ve kuyruk yapısıyla dikkat çeker. Siyah parlak rengiyle estetik bir görüntü sunar (Yılmaz ve Özbilen 2011).

Küçük yapılı ama güçlü olan Haflinger, Avusturya kökenlidir ve dağlık alanlarda hem binicilik hem yük taşıma için kullanılır. Dayanıklı, sağlam yapılı ve dost canlısı bir ırktır. Pony sınıfına girmese de, küçük cüssesi sayesinde çocuklar için binicilik eğitiminde idealdir.

Shetland Pony gibi küçük boylu ırklar ise hem çocuk biniciliği hem de terapi amaçlı kullanılır. Aynı zamanda bu tip atlar, bazı bölgelerde yük taşımacılığı ve madenlerde de kullanılmıştır. Boylarının küçük olması onları daha sevimli ve kontrol edilebilir kılsa da, inatçı mizaçları nedeniyle sabırlı bir eğitim süreci gerekir.

Türkiye’de yetiştirilen yerli at ırkları da oldukça önemlidir. Özellikle Anadolu Atı, Çukurova Atı, Canik, Midilli (Karakaçan) ve Rahvan gibi ırklar, farklı bölgelerde farklı amaçlarla yetiştirilmiştir. Bunlar genellikle dayanıklı, az yemle yetinebilen, sert iklim şartlarına uyumlu atlar olup kırsal yaşamda önemli görevler üstlenmişlerdir. Ayrıca Türkiye, Arap atı yetiştiriciliği konusunda da dünyanın önde gelen ülkelerinden biridir (Payne ve ark. 2005).

EŞEK

Eşekler (*Equus asinus*), atgiller (Equidae) familyasına ait, tek toynaklı ve evcilleştirilmiş memelilerdir. Atlarla yakın akraba olmalarına rağmen, fiziksel yapıları, davranışları, çevresel adaptasyonları ve kullanım alanları açısından birçok farklılık gösterirler. İnsanlık tarihi boyunca özellikle yük taşıma ve ulaşımda önemli rol üstlenmiş olan eşekler, bugün hâlâ birçok kırsal alanda vazgeçilmez bir yardımcıdır.

Eşeklerin Genel Özellikleri

Eşekler, kökeni Afrika’nın kurak bölgelerine dayanan dayanıklı ve kanaatkâr hayvanlardır. Atgiller familyasındaki en eski evcilleştirilmiş türlerden biridir. Vahşi atlara kıyasla daha kısa boylu, daha kalın gövdeli ve

sert koşullara karşı daha dirençlidirler. Ortalama cıdago (omuz yüksekliği) 90 ila 140 cm arasında değişir. Ağırkları ise genellikle 100 ila 300 kg civarındadır. Ancak bu değerler, cins, beslenme ve çevresel faktörlere göre değişebilir (Sikandar 2020).

Vücutları sağlam yapılı olup bacakları atlara kıyasla daha kısa ve kalındır. Kulakları uzun, hareketli ve duyarlıdır; bu, hem ses algılamalarını artırır hem de ısı regülasyonunda rol oynar. Kuyrukları uzun ve fırçamsı yapıdadır. Tüyleri kısa, sık ve genellikle gridir; ancak kahverengi, siyah ya da açık renkli eşekler de bulunur. Vücutlarının ortasında sırt boyunca uzanan koyu renkli bir çizgi ve omuz hizasında bu çizgiyi kesen başka bir çizgi (ester çizgisi) görülmesi, eşeklerde yaygın morfolojik bir özelliktir (Hannani ve ark. 2020).

Fizyolojik olarak eşeklerin vücut ısısı ortalama 37.2-38.3 °C arasındadır. Kalp atım sayısı dakikada 36-44, solunum sayısı ise 12-20 arasındadır. Bu değerler atlara oldukça benzese de, eşekler stres altında daha az belirti verirler, bu nedenle hastalık semptomları daha geç fark edilebilir. Gebelik süresi oldukça uzundur; ortalama 11 ila 14 ay arasında değişir. Genellikle tek yavru doğururlar. Yavrular doğduğunda ayakta durup kısa sürede emmeye başlarlar. Eşegin yavrusuna “sıpa” denir.

Sindirim sistemleri tıpkı atlar gibi tek midelidir ancak yüksek selülozlu yemleri sindirebilmek için geniş bir sekum ve kolona sahiptirler. Bu sayede düşük kaliteli kaba yemlerle hayatta kalabilirler. Bu özellik, onları fakir otlaklarda bile yaşayabilen nadir evcil hayvanlardan biri yapmaktadır. Günde çok az miktarda su tüketmeleriyle bilinirler ve su bulamadıkları durumlarda idrarlarını konsantre hâlde dışkılararak su kaybını en aza indirirler. Bu özellikleri, kurak iklimlere mükemmel şekilde uyum sağladıklarının bir göstergesidir (Gürcan ve ark. 2022).

Eşekler karakter olarak genellikle sabırlı, sessiz ve sakın yapılıdır. Ancak bu sakınlık çoğu zaman yanlış şekilde "inatçılık" olarak değerlendirilir. Aslında eşekler temkinli hayvanlardır ve tehlike sezdiklerinde durup düşünürler; bu da bazı insanlarca itaatsizlik olarak algılanır. Hafızaları oldukça güçlüdür. Bir kişi veya yeri yıllar sonra bile hatırlayabilirler. Ayrıca sosyal hayvanlardır ve yalnız kaldıklarında strese girip iştahsızlık, durgunluk gibi belirtiler gösterebilirler.

Sağlık açısından eşekler genellikle dayanıklı canlılar olarak bilinir. Ancak düzenli bakım yapılmadığında dış problemleri, toynak bozuklukları, parazitler enfestasyonlar ve zayıflık gibi sorunlar ortaya çıkabilir. Özellikle toynakları çabuk uzadığı için düzenli aralıklarla kesilmeli, dişleri kontrol edilmeli ve iç-dış parazitlere karşı korunmalıdır. Aşı programları atlarla benzer şekilde planlanır; tetanoz, influenza ve bazı bölgelerde kuduz aşılı önerilir. Beslenme açısından aşırı tahıl ve enerji yoğun yemlerden kaçınılmalıdır. Çünkü eşekler kolayca kilo alabilir ve obeziteye bağlı metabolik hastalıklar (örneğin laminitis) gelişebilir (Mendoza ve Toribio 2025).

Günümüzde eşekler hâlâ birçok kırsal bölgede yük hayvanı olarak kullanılmaktadır. Dağlık ve engebeli arazilerde yol tutuşları iyidir. Ayrıca birçok ülkede eşek sütü üretimi de yaygınlaşmıştır. Eşek sütü, anne sütüne en yakın bileşime sahip sütlerden biri olarak kabul edilir ve bazı tıbbi/tıbbi olmayan gıda ürünlerinde tercih edilmektedir.

Sonuç olarak eşekler, bakım gereksinimi düşük, dayanıklılığı yüksek ve insanlarla kurdukları uzun süreli bağlarıyla değerli çiftlik hayvanlarıdır (Mendoza ve Toribio 2025).

Eşek Irkları

Eşek ırkları, köken aldıkları bölgeye, vücut yapılarına, kullanım amaçlarına ve fizyolojik özelliklerine göre sınıflandırılır. At ırklarına göre daha az sayıda olsalar da, eşek ırkları da dünya genelinde farklı coğrafyalara özgü olarak evrimleşmiş ve insanlar tarafından geliştirilmiştir.

Eşekler, özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde yük taşıma, ulaşım ve tarımda yüzyıllardır kullanılan dayanıklı ve kanaatkâr hayvanlardır. Evcilleştirilmiş eşeklerin atası, Afrika'ya özgü *Equus africanus* türüdür. Bugün dünyada farklı iklim ve coğrafyalara uyum sağlayarak gelişmiş birçok eşek ırkı bulunmaktadır. Bu ırklar, sahip oldukları morfolojik ve fizyolojik özelliklere göre farklı amaçlarla değerlendirilir (Zerek ve ark. 2024).

En tanınmış eşek ırklarından biri olan Andalusian (İspanyol) eşeği, İspanya kökenlidir ve iri yapılı, güçlü bir ırktır. Bu eşekler genellikle yük ve taşıma işlerinde kullanılır. Kas yapıları belirgin, kemik yapıları kalındır. Ayrıca uysal mizaçları sayesinde eğitimleri kolaydır. Aynı zamanda bazı ülkelerde atlarla melezlenerek katır elde etmek için de tercih edilen damızlık ırklardan biridir (Hannani ve ark. 2020).

Mammoth Jackstock, Amerika Birleşik Devletleri'nde geliştirilen bir eşek ırkıdır ve dünyadaki en büyük eşek ırklarından biridir. Bu eşekler özellikle iri yapılıdır; bazı bireylerin cıdago yüksekliği 150 cm'yi geçebilir. Bu ırkın temel kullanım amacı da atlarla çaprazlanarak iri ve dayanıklı katırlar üretmektir. Güçlü, uzun bacaklı ve sessiz yapısıyla tanınır.

Fransız Poitou eşeği, oldukça uzun, kalın tüylü ve dikkat çekici bir görünüme sahiptir. Bu ırk, Fransa'nın batısındaki Poitou bölgesinde geliştirilmiş ve geçmişte özellikle tarım alanlarında güçlü katırların üretimi için kullanılmıştır. Tipik olarak kabarık, keçeleşmeye yatkın tüyleri ve iri gövdesiyle diğer ırklardan kolaylıkla ayırt edilir.

Katalan eşeği, İspanya'nın Katalonya bölgesine özgüdür. Uzun bacakları, kısa tüyleri ve enerjik yapısıyla öne çıkar. Bu eşekler genellikle sportif yapıdadır ve hem yük taşıma hem de katır üretimi için kullanılır. Dayanıklılığı sayesinde günlük arazilerde de rahatlıkla çalışabilir.

Meksika eşeği ya da Burro, Orta ve Güney Amerika'da yaygın olarak bulunan bir ırktır. Genellikle küçük yapılıdır ancak çevik ve dayanıklıdır. Yüksek sıcaklıklara ve az yemle yaşamaya çok iyi adapte olmuşlardır. Aynı zamanda yerel halkın ulaşımında hâlâ yaygın olarak kullanılan bir ırktır (Gürcan ve ark. 2022).

Mısır eşeği, Kuzey Afrika'da yaygın görülen yerli bir ırktır. Küçük cüsseli olmasına rağmen dayanıklıdır. Fakir otlaklardan beslenebilir ve az su tüketimi ile yaşamını sürdürebilir. Genellikle kırsal alanlarda yük taşıma işlerinde kullanılır. Bu ırk, seleksiyon veya saf yetiştiricilikten çok doğal seçimle şekillenmiştir.

Türkiye'de ise belirginleşmiş ve isimlendirilmiş saf eşek ırkları çok sınırlı olsa da, yerli eşek popülasyonu, Anadolu'nun farklı bölgelerinde çeşitli adaptasyon özellikleri göstermektedir. Doğu Anadolu'da daha dayanıklı ve iri yapılı eşekler görülürken, Ege ve Akdeniz bölgelerinde daha küçük ve çevik bireyler yaygındır. Türkiye'deki eşekler de tıpkı atlar gibi katır üretiminde önemli rol oynar. Ancak günümüzde sanayileşme ve teknolojik tarım araçlarının yaygınlaşmasıyla bu ırklar ve yerli gen kaynakları hızla azalmaktadır (Mendoza ve Toribio 2025).

Bunun yanı sıra bazı özel eşek türleri de turizm ve terapi amacıyla değerlendirilmeye başlanmıştır. Örneğin Miniature Donkey olarak bilinen cüce eşekler, boyutları

küçük, dost canlısı mizaçları sayesinde özellikle çocuk terapilerinde ve evcil hayvan olarak popülerlik kazanmaktadır. Bu ırk, genellikle 90 cm'den daha kısa cıdago yüksekliğine sahiptir ve gösteri amaçlı da kullanılır (Sikandar 2020).

ZEBRA

Zebralar, atgiller familyasının (Equidae) dikkat çeken üyelerinden biridir ve genellikle siyah-beyaz çizgili gövdeleriyle tanınırlar. Görsel olarak at ve eşeğe benzeyen bu hayvanlar, davranışları, yaşam tarzları ve biyolojik özellikleri bakımından bazı önemli farklar gösterir.

Zebraların Genel Özellikleri

Zebralar, Afrika kıtasına özgü yabani tek toynaklı memelilerdir ve *Equus* cinsine ait olmaları nedeniyle at ve eşeklerle yakın akrabadırlar. Bu üç türün ortak atadan evrimleştiği düşünülmektedir. Günümüzde bilinen üç temel zebra türü vardır: Düzayak-Bayağı zebra, Dağ zebrası ve Grevy zebrası. Bu türler, fiziksel görünimleri, çizgi yapıları ve yaşam alanlarına göre birbirinden ayrılır (Hosey ve ark. 2009).

Zebraların en belirgin özelliği, her bireyde farklılık gösteren siyah-beyaz çizgili derileridir. Her zebranın çizgileri parmak izi gibi kendine özgüdür. Bu çizgilerin evrimsel olarak ne amaçla geliştiği hâlâ tartışmalı olmakla birlikte; kamuflaj, sinek ve böcek kovucu etkisi, bireylerin birbirini tanıması ya da vücut ısısını düzenleme gibi farklı teoriler öne sürülmektedir. Çizgiler, türlere göre farklılık gösterir: Örneğin düzayak zebralarda çizgiler kalın ve yatayken, Grevy zebrasında daha ince ve dikeydir (Brink 2025).

Fiziksel yapıları, atlara benzer olmakla birlikte daha kısa boylu ve daha tıknazdırlar. Grevy zebrası, türleri arasında en irisi olup omuz yüksekliği 145 cm'ye kadar ulaşabilirken, dağ zebraları ve düzayak zebralar genellikle 120–135 cm civarındadır. Ağırlıkları da türe bağlı olarak 200 ila 400 kilogram arasında değişir. Vücut yapıları dayanıklı, bacakları güçlü ve ayakları çevik hareket etmeye uygundur. Koşu yetenekleri oldukça gelişmiştir; kısa mesafelerde 60–65 km/s hızlara ulaşabilirler.

Zebralar, sosyal hayvanlardır ve genellikle sürüler halinde yaşarlar. Düzayak ve dağ zebraları, daha küçük ve kalıcı aile gruplarında bulunurken, Grevy zebraları daha gevşek ve geçici topluluklar oluşturur. Sürü içi iletişimde sesler, yüz ifadeleri, kulak ve kuyruk hareketleri gibi beden dili unsurları kullanılır. Aynı zamanda tehlike anında yüksek sesle kişneyerek veya homurdanarak uyarı verirler (Ireland ve Ruxton 2025).

Beslenme açısından otçul hayvanlardır ve genellikle otlaklarda ot, yaprak, dal ve çalılardan beslenirler. Sindirim sistemleri at ve eşekler gibi tek midelidir. Yani lifli bitkileri sindirmek için geniş bir sekum ve kalın bağırsakta mikrobiyal fermentasyondan faydalanırlar. Bu sayede düşük kaliteli otlarla bile hayatta kalabilirler, ancak daha sık beslenme ihtiyaçları vardır.

Zebraların yaşam alanları, türlerine göre değişiklik gösterir. Düzayak zebralar daha çok Afrika savanalarında yaşarken, dağ zebraları kayalık ve eğimli arazileri tercih eder. Grevy zebraları ise daha kuru ve çöl benzeri ortamlarda bulunur. Bu farklılıklar, türlerin ayak yapısından davranışlarına kadar pek çok özelliğini etkiler. Örneğin dağ zebralarının ayakları daha sert ve kavrayıcıdır; bu da onların kayalıklarda rahatça hareket etmesini sağlar (Kaplan ve Tufan 2018).

Üreme sistemleri diğer tek toynaklılara benzer. Gebelik süresi yaklaşık 12 ila 13 ay sürer. Dişi zebra genellikle tek yavru doğurur. Yavru, doğumdan kısa bir süre sonra ayağa kalkabilir ve annesiyle birlikte sürüye katılır. Anne zebra, yavrusunu uzun süre tanıyabilmek için doğumdan sonraki ilk birkaç saat boyunca yavruyu koklayarak, sesini tanıyarak ve desenine bakarak hafızasına kazımaktadır.

Zebralar doğal ortamlarında birçok yırtıcının avıdır. Özellikle aslanlar, çitalar ve sırtlanlar, zebra sürülerine saldıran başlıca yırtıcılardır. Bu nedenle zebralar çevik, dikkatli ve sürü halinde hareket eden canlılardır. Savunma anında arka ayaklarıyla oldukça güçlü tekmeler atabilirler.

Evcil hayata uyum sağlayamamış olmalarıyla da dikkat çekerler. At ve eşekler binlerce yıl önce evcilleştirilmişken, zebralar insanların yanında yaşamakta zorlanmış, eğitime direnç göstermiş ve vahşi doğalarını korumuşlardır. Bunun nedeni, hem yüksek stres tepkileri hem de sinirsel yapılarındaki farklardır. Bunun yanı sıra zebraların morfolojik özellikleri binek ve yük hayvanı olarak kullanıma elverişli değildir. Özellikle cidago yüksekliklerinin sırt yüksekliklerine benzer ölçüde olması binici konforunu bozmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı zebralar, atlar gibi yük veya binek hayvanı olarak kullanılmazlar (Ireland ve Ruxton 2025).

Zebralar Türleri

Zebralar, atgiller (Equidae) familyasının üç temel türünden biridir ve evcilleştirilmemiş, yabani tek toynaklılardır.

1. Bayağı (Düzayak) Zebra (*Equus quagga*)

Dünyadaki en yaygın zebra türüdür ve Afrika'nın doğu ve güney bölgelerinde geniş bir alana yayılmıştır. Orta büyüklükte bir zebra türüdür. En karakteristik özelliği, vücudundaki siyah-beyaz çizgilerin vücudun arka kısmına doğru incilmesi veya kaybolmasıdır. Karın altı genellikle beyazdır. Kuyruk ve bacaklarda çizgilenme daha belirgindir (Prinsloo ve ark. 2021).

Alt türleri şunlardır:

- **Burchell's zebra (*E. quagga burchellii*):** En yaygın alt türdür. Güney Afrika'da yaygındır. Çizgileri karında kaybolur.
- **Grant's zebra (*E. quagga boehmi*):** Doğu Afrika'da bulunur. Çizgileri daha sık ve incedir, karın bölgesine kadar uzanır.
- **Chapman's zebra (*E. quagga chapmani*):** Namibya, Botswana ve Zimbabwe'de görülür. Bacaklarındaki çizgiler kısmen gölgeli veya kırık olabilir.
- **Selous' zebra (*E. quagga selousi*):** Güneydoğu Afrika'ya özgüdür, nadir görülür.
- **Quagga (*E. quagga quagga*):** Soyu tükenmiş bir alt türdür. Ön kısmında çizgiler yoğun, arka kısmı neredeyse tamamen kahverengiydi. 19. yüzyılda nesli tükendi. Son yıllarda genetik "Quagga Projesi" ile bu türün bazı özelliklerini taşıyan bireyler yeniden üretilmeye çalışılmaktadır.

2. Dağ Zebrası (*Equus zebra*)

Yüksek dağlık ve kayalık bölgelerde yaşayan bir türdür. Diğer zebra türlerine göre daha küçük yapılıdır ve dik yamaçlarda kolayca hareket edebilecek güçlü toynak yapısına sahiptir. Karakteristik olarak, boynunda belirgin bir "boğaz kesesi" (deri çıkıntısı) bulunur ve tüyleri biraz daha uzundur. Karın kısmı genellikle beyazdır.

İki alt türü vardır:

- **Cape Dağ Zebrası (*E. zebra zebra*):** Güney Afrika'daki Cape bölgesine özgüdür. Nesli tehlike altındadır ve koruma altına alınmıştır.
- **Hartmann's Dağ Zebrası (*E. zebra hartmannae*):** Namibya'nın çölleşmiş bölgelerinde yaşar. Daha dayanıklı ve geniş alanlarda dolaşan bir alt türdür.

3. Grevy Zebrası (*Equus grevyi*)

Zebralar türleri içinde en iri ve en farklı yapıya sahip olanıdır. Atlara morfolojik olarak daha çok benzer. Cidago yüksekliği ortalama 140-160 cm'yi bulabilir. İnce ve sık çizgileri, beyaz karın bölgesi ve büyük yuvarlak kulakları ile ayırt edilir. Sürüler halinde değil, daha gevşek topluluklar içinde yaşarlar. Genellikle Kenya ve Etiyopya'nın yarı kurak bölgelerinde bulunur.

Alt türü yoktur, ancak popülasyon sayısı oldukça düşüktür (Hosey ve ark. 2009; Prinsloo ve ark. 2021).

Nadir olmakla birlikte, farklı zebra türleri veya zebra ile at/eşek arasında melezlemeler yapılabilmektedir. Bu tür melezler genellikle doğurgan değildir.

- Zonkey (Zebra + Eşek)
- Zorse (Zebra + At)
- Hebra (Zebra + Kısırak)

TAPİR

Tapirler, görünüş olarak domuz veya su aygırını andırırlar da, aslında tek toynaklılar (Perissodactyla) takımına ait, at, eşek ve gergedanlarla yakın akraba olan ilginç memelilerdir. Tropikal bölgelerde yaşayan bu utangaç hayvanlar, biyolojik çeşitliliğin korunmasında önemli rol oynar (Goździewska-Harłajczuk ve ark. 2020).

Tapirin Genel Özellikleri

Tapirler, Güney ve Orta Amerika ile Güneydoğu Asya'nın tropikal yağmur ormanlarında yaşayan, iri yapılı ve otçul memelilerdir. Günümüzde dünyada yaşayan dört farklı tapir türü vardır ve hepsi nesli tükenme tehdidi altında olan hayvanlar arasında yer alır. Bu canlıların en dikkat çekici özelliği, kısa ama güçlü bir hortum şeklini almış burun yapılarıdır. Bu burun, aslında üst dudak ve burnun birleşerek uzamasıyla oluşmuştur ve tapirler bu organı besinleri kavramak, koklamak, suya erişmek ve çevreyi keşfetmek için kullanırlar. Diş yapısında, özellikle ön dişlerde farklılıklar vardır. Yanak dişleri köpek dişlerinden diastema ile ayrılır (Goździewska-Harłajczuk ve ark. 2020).

Vücut yapıları kalın, tıknaz ve kaslıdır. Ortalama bir tapir, 150-250 cm uzunluğunda, 75-120 cm yüksekliğinde olabilir ve ağırlığı 150 ila 300 kilogram arasında değişir. Dişiler genellikle erkeklerden biraz daha büyüktür. Kısa, kalın bacakları ve dört parmaklı ön ayakları ile üç parmaklı arka ayakları, onlara bataklık, çamurlu ve ormanlık arazide dengeli hareket etme imkânı sağlar. Derileri kalın ve serttir, bu sayede dikenli bitkilerden ve böceklerden korunurlar.

Tapirlerin tüy renkleri türlerine göre değişiklik gösterir. Güney Amerika türleri genellikle koyu kahverengi ya da siyaha yakinken, Malezya tapiri (*Tapirus indicus*) karakteristik olarak siyah-beyaz renklidir; ön kısmı siyah, arka kısmı beyazdır. Bu desenin, orman zemininde kamuflaj sağlamaya yönelik bir evrimsel adaptasyon olduğu düşünülmektedir. Yeni doğan tapir yavrularının hepsi tür ayırt etmeksizin benekli ve çizgilidir. Bu desen, yavruların ormanlık alanda daha iyi gizlenmesini sağlar; 6-8 ay içinde bu desen kaybolur ve erişkin renge dönüşür.

Tapirler genellikle geceleri aktiftir; gündüzleri sık bitki örtüsü arasında gizlenir, geceleri yiyecek aramaya çıkarlar. Otçulduklar ve diyetleri yapraklar, genç sürgünler, meyveler ve su bitkilerinden oluşur. Diğer tek toynaklılara göre sindirim sistemleri daha karmaşıktır ve doğal besin ihtiyaçları karşılanmadığında obezite, diş problemleri ve gastrointestinal bozukluklar gibi sağlık sorunları görülebilir. Suya olan ilgileri oldukça fazladır; yüzmeyi çok iyi bilirler, sık sık suya girerler ve hem serinlemek hem de parazitlerden kurtulmak için bataklıklarda vakit geçirirler. Burun yapıları sayesinde suda nefeslerini uzun süre tutabilirler. Ayrıca, sıkıştıklarında suya kaçarak yırtıcılardan kurtulma stratejileri vardır. Ayrıca esaret altında stres kaynaklı davranış bozuklukları da yaygın olarak izlenebilir (Dumbá ve ark. 2019).

Davranışsal olarak genellikle yalnız yaşarlar. Erkekler ve dişiler üreme döneminde bir araya gelir. Dişiler ortalama 13-14 ay süren uzun bir gebelik dönemi geçirir ve genellikle tek bir yavru doğururlar. Yavru doğduktan kısa süre sonra yürümeye başlar ancak sütten kesilmesi 6 aya kadar sürebilir. Cinsel olgunluğa ulaşmaları 3-4 yaşını bulur.

Tapirlerin doğal düşmanları arasında jaguar, timsah ve kaplan gibi büyük yırtıcılar yer alır. Ancak günümüzde en büyük tehdit, insan kaynaklıdır: ormanların yok edilmesi, yaşam alanlarının parçalanması, yasa dışı avcılık ve su kaynaklarının kirlenmesi, tapirlerin hızla azalmasına neden olmaktadır (MacLaren ve Nauwelaerts 2016).

Tapirler ekto parazitlere ve endo parazitlere duyarlıdır. Keneler hastalık bulaştırması açısından tapirler için önemli risk teşkil eder. Anemi ve sarılık tapirlerde görülen önemli klinik bulgulardır. Sulu ishal hayvanat bahçesindeki tapirlerde beslenme eksikliğine bağlı olarak görülebilir. Tapirlerde düzenli bir aşılama programı yoktur. Tetanoz, kuduz ve endemik bölgelerde ensefalomyelit virusuna karşı aşılama veteriner hekim kontrolünde yapılabilir (Zimmerman ve Hernandez 2015).

Tapir Türleri

Tapirler, dünyada dört farklı tür olarak bulunur ve bunlar genellikle tapir türleri olarak adlandırılır. At, eşek gibi evcilleştirilmiş hayvanlarda olduğu gibi insan eliyle ıslah edilmiş farklı ırklardan söz edilmez; daha çok coğrafi ve morfolojik özelliklerine göre ayrılmış türlerdir. (Medici ve ark. 2022).

Güney Amerika Tapiri (Büyük Tapir)-*Tapirus terrestris*: Genellikle "Orinoco tapiri" veya "Amazon tapiri" olarak da bilinir. En yaygın tapir türüdür. Güney Amerika'nın Amazon havzası ve çevresinde yaşar. Vücutları genellikle koyu kahverengi veya siyahımsıdır, bazen yanlarda açık kahverengi tonları görülür. Suya ve bataklıklara yakın yaşamayı sever. Oldukça iri yapılıdır, ağırlığı 150-300 kg arasında değişir.

Baird Tapiri-*Tapirus bairdii*: Orta Amerika (Meksika'nın güneyi, Guatemala, Honduras, Nikaragua, Kosta Rika ve Panama) ve kuzey Güney Amerika'da bulunur. En büyük Orta Amerika tapir türüdür. Renkleri genellikle kahverengimsi siyahtır, yüzünde ve boynunda açık renkli lekeler olabilir. Nesli tükenme tehlikesi altında sayılır.

Malaya (Malezya) Tapiri -*Tapirus indicus*: Tek tapir türü Asya'da bulunan bu türdür ve en büyük tapirdir. Güneydoğu Asya'nın yağmur ormanlarında yaşar (Endonezya, Malezya, Tayland, Myanmar). Siyah-beyaz renk desenine sahiptir; ön ve arka kısımları siyah, orta gövde beyazdır. Bu renk deseni kamuflaj sağlar. Ortalama ağırlığı 250-300 kg civarındadır. Diğer tapirlere göre daha uzun ve daha incedir.

Dağ (Küçük) Tapiri-*Tapirus pinchaque*: Güney Amerika'nın And Dağları'nın yüksek rakımlı ormanlarında yaşar. Vücutları diğer tapir türlerine göre daha küçüktür ve koyu kahverengi-siyah renkli tüylere sahiptir. Yüksek rakımlara adaptasyon sağlamıştır ve soğuk iklim koşullarına dayanıklıdır. Nesli tehdit altındadır (MacLaren ve Nauwelaerts 2016; Medici ve ark. 2022).

GERGEDAN

Gergedanlar, dünyanın en büyük kara memelileri arasında yer alan, kalın derili ve oldukça güçlü yapıya sahip hayvanlardır. Tek toynaklılar (Perissodactyla) takımına ait olup, at ve tapir gibi diğer üyelerle akrabadırlar. Hem morfolojik özellikleri hem de ekolojik rolleri bakımından önemli bir hayvan grubudur. Gergedan ve tapirlerin soyları kritik derecede tükenme tehlikesi altında olduğu için korunma altındadırlar.

Gergedanların Genel Özellikleri

Gergedanlar iri, kaslı ve genellikle kısa boyludur. Boyları 1.2 ila 1.8 metre arasında değişirken, ağırlıkları 800 kilogramdan başlayıp bazı türlerde 2 tona kadar ulaşabilir. Vücutları oldukça güçlüdür, kalın ve sert deri ile kaplıdır. Bu deri, kimi bölgelerde 5 cm kalınlığa kadar ulaşarak adeta bir zırh işlevi görür. Deri üzerinde derin kıvrımlar ve çatlaklar bulunabilir; bu yapı onların hareket kabiliyetini kısıtlamadan koruma sağlar.

Gergedanların her yarım çenede 3 azı dişi ve 3 küçük azı dişi vardır. Bazı ırklarda bu durum farklılık gösterir (Dinerstein ve Wemmer 1988).

Gergedanların en karakteristik özelliklerinden biri, burunlarının üstünde bulunan genellikle bir veya iki adet keratin yapısından oluşan boynuzlarıdır. Bu boynuzlar, diğer hayvanlardan farklı olarak kemik değil, sıkışmış keratin liflerinden meydana gelir ve büyüklükleri türlere göre değişir. Boynuzlar, savunma, bölge işaretleme ve dişiler için kur yapma davranışlarında kullanılır (Sneddon ve Argenzio 1998).

Bacakları kalın ve dayanıklıdır; her bir ayakta üç parmak bulunur ve bu parmaklar üzerinde büyük, sağlam toynaklar yer alır. Bu yapı, gergedanların ağır vücutlarını destekleyip, ormanlık ve çalılık alanlarda dengeli yürümelerine olanak tanır. Gergedanların kulakları küçük ve yuvarlak, gözleri ise nispeten küçüktür; ancak görme duyuları sınırlı olmakla birlikte koku ve işitme duyuları oldukça gelişmiştir.

Beslenme açısından gergedanlar genellikle otçulduklar. Bazı türler (örneğin beyaz gergedan) ağırlıklı olarak çimen yerken, diğerleri (siyah gergedan gibi) yaprak, dal ve sürgünlerle beslenir. Sindirim sistemleri tek mideli olup, lifli bitkileri sindirmek için geniş çekum ve kalın bağırsakta mikroorganizma desteğiyle fermentasyon yaparlar. Bu sayede düşük kaliteli bitkisel materyali de enerjiye dönüştürebilirler.

Gergedanların sosyal yapısı türlere göre değişiklik gösterir. Bazı türler yalnız yaşamayı tercih ederken, bazıları küçük gruplar halinde bulunabilir. Üreme dönemi genellikle belirgindir ve erkekler dişiler için yoğun rekabet içine girer. Gebelik süresi yaklaşık 15-16 ay olup, doğan yavru genellikle tek ve oldukça gelişmiş olarak dünyaya gelir. Yavru, annesine sıkıca bağlıdır ve birkaç yıl boyunca onunla birlikte hareket eder (Sneddon ve Argenzio 1998).

Doğal yaşam alanları Afrika ve Güneydoğu Asya'nın tropikal ormanları, savanaları ve çalılık bölgeleridir. Ancak gergedanlar, özellikle boynuzları nedeniyle yasa dışı avcılığın hedefi olmuş ve birçok türü ciddi şekilde tehdit

altındadır. Bugün, özellikle beyaz ve siyah gergedanlar koruma programları kapsamında izlenmekte ve yaşam alanlarının korunması için çalışmalar yapılmaktadır (Kelloggve ark. 2007).

Gergedan Türleri

1. Beyaz Gergedan (*Ceratotherium simum*): Afrika'nın güney ve doğu bölgelerinde bulunur. Dünyadaki en büyük kara memelilerden biridir ve ağırlığı 2 tona kadar çıkabilir. Adı "beyaz" olarak geçse de aslında açık gri renklidir. Geniş ağız yapısı, otlarla beslenmeye uyum sağlamıştır. Sosyal yapısı daha grup halinde yaşama eğilimindedir. Alt tür olarak Güney Afrika beyaz gergedanı ve Kuzey Beyaz Gergedanı vardır (O'Connell-Rodwell ve ark. 2006).

2. Siyah Gergedan (*Diceros bicornis*): Afrika'nın doğu ve güney bölgelerinde yaşar. Beyaz gergedandan daha küçüktür ve daha ince, sivri ağız yapısına sahiptir; bu da yaprak ve dalları koparmaya uygun bir adaptasyondur. Genellikle daha yalnızdır.

3. Hint Gergedanı (*Rhinoceros unicornis*): Hindistan ve Nepal'de yaşar. Tek boynuzludur ve kalın, zırh benzeri deri yapısına sahiptir. Genellikle sulak alanlara yakın otlaklarda bulunur. Ortalama ağırlığı 2 tona kadar çıkabilir.

4. Javan Gergedanı (*Rhinoceros sondaicus*): Endonezya ve Vietnam'ın bazı bölgelerinde yaşar. Hint gergedanına benzer fakat biraz daha küçüktür ve daha az belirgin deri kıvrımları vardır.

5. Sumatra Gergedanı (*Dicerorhinus sumatrensis*): Dünyanın en küçük gergedan türüdür. Sumatra ve Malezya'nın yağmur ormanlarında yaşar. İki boynuzludur ve vücutları kıllarla kaplıdır, bu da onları diğer gergedan türlerinden ayırır. Genellikle yalnız yaşar (O'Connell-Rodwell ve ark. 2006).

SONUÇ

Tek toynaklılar, evrimsel, anatomik ve fizyolojik özellikleriyle hem biyolojik çeşitlilik hem de veteriner hekimlik açısından önemli bir hayvan grubunu oluşturmaktadır. Atve eşek gibi türler; insanlık tarihi boyunca ulaşım, tarım, savaş ve spor gibi pek çok alanda önemli roller üstlenmiştir. Bu hayvanların tek parmak yapısına dayanan hızlı hareket kabiliyetleri ve gelişmiş bağırsak fermentasyonu ile lifli yemleri sindirme yetenekleri, çevresel adaptasyon açısından büyük avantaj sağlamaktadır. Tek toynaklıların bitki liflerini kalın bağırsakta sindirmesi; besinlerin sindirim kanalını hızlı geçmesini ve bazı bitki toksinlerini mide asitleri ile nötralize etmesini sağlar. Ancak bu özgün yapılar aynı zamanda bazı sağlık problemlerine yatkınlık da doğurur. Özellikle sindirim sistemi bozuklukları, ortopedik hastalıklar, toynak problemleri ve davranışsal hassasiyetler, tek toynaklıların veteriner hekim bakımında özel bir yaklaşım gerektirdiğini göstermektedir. Ayrıca spor ve performans hayvanı olarak kullanımları, koruyucu hekimlik ve rehabilitasyon uygulamalarının önemini artırmaktadır. Sonuç olarak, tek toynaklılar; biyolojik özellikleri, evcil türler içerisindeki yeri ve insan yaşamındaki çok yönlü kullanım alanları ile hem bilimsel araştırmalarda hem de pratik veteriner hekim uygulamaları üzerinde durulması gereken çok yönlü bir konudur. Bu türlerin sağlıklı bir şekilde yaşatılması ve verimli olarak kullanılabilmesi, ancak iyi bir bakım, besleme ve düzenli veteriner hekim kontrolü ile mümkün olabilir. Evcil üyeler binek ve yük taşıma gibi faaliyetlerde insanlara önemli hizmetler sunarken yabani üyeler ekolojik dengenin korunmasında ve hayvanat bahçelerinde süs hayvanı olarak katkı sağlamaktadır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

YAZAR KATKILARI

Fikir/Kavram: YP, DA
Denetleme/Danışmanlık: YP, DA
Veri Toplama ve/veya İşleme: YP, DA
Analiz ve/veya Yorum: YP, DA
Makalenin Yazımı: YP, DA
Eleştirel İnceleme: YP, DA

KAYNAKLAR

- Andrews FM (2015).** Gastric juice pH measurement in horses: Three-quarters of a century of history. *Equine Vet Educ.* 27(12), 633-636.
- Brink B (2025).** What Are the Favorite Foods of Lions, Tigers & Bears ? The San Diego Animal Sanctuary.
- Costa LRR (2017).** History and physical examination of the horse. In: Manual of Clinical Procedures in the Horse (Eds: Costa LRR, Paradis MR). pp.1-688.
- Cozzuol MA, Clozato CL et al. (2013).** A new species of tapir from the Amazon. *J Mammal*, 94(6), 1331-1345.
- Dinerstein E, Wemmer CM (1988).** Fruits Rhinoceros Eat: Dispersal of *Trewia nudiflora* (Euphorbiaceae) in Lowland Nepal. *Ecology*, 69(6), 1768-1774.
- Doğan E, Kapçak A (2023).** Thermographic evaluation of distal extremities in healthy horses. *Antakya Vet Bil Derg*, 2(2), 56-60.
- Dumbá LCSS, Dutra RP, Cozzuol MA (2019).** Cranial Geometric Morphometric Analysis of the Genus *Tapirus* (Mammalia, Perissodactyla). *J Mamm Evol*, 26, 545-555.
- Gordon IJ, Prins HHT (2023).** Forage Consumption and Digestion in the Modern Equids. In: Prins HHT, Gordon IJ (eds) *The Equids. Fascinating Life Sciences*. Springer, Cham, pp. 143-170.
- Goździewska-Harłajczuk K, Hamouzová P, Klećkowska-Nawrot J, Barszcz K, Čížek P (2020).** Microstructure of the surface of the tongue and histochemical study of the lingual glands of the Lowland Tapir (*Tapirus terrestris* Linnaeus, 1758) (Perissodactyla: Tapiridae). *Anim*, 10(12), 2297.
- Gürçan K, Genç S, Kaplan S ve ark. (2022).** Determination of the morphometric characteristics of donkey (*Equus asinus*) populations reared in Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 46(3), 445-456.
- Hannani H, Bouzebda Z, Bouzebda-Afri F, Hannani A, Khemis MDEH (2020).** Morphometric characteristics of the extreme eastern algerian domestic donkey (*Equus asinus*). *Folia Vet*, 64(1), 66-76.
- Hosey G, Melfi V, Pankhurst S (2009).** *Zoo Animals: Behaviour, Management, and Welfare*. Oxford University.
- Ireland HM, Ruxton GD (2025).** Zebra stripes: the questions raised by the answers. *Biol Rev*, 100(6), 2660-2680.
- Kaplan O, Tufan T (2018).** Afetzedde hayvanlarda bakım ve besleme. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci/Surg-Special Topics*, 4(1), 39-54.
- Kellogg M, Burkett S, Dennis TR et al. (2007).** Chromosome painting in the manatee supports Afrotheria and Paenungulata. *Evol Biol*, 7, 6.
- Kocakaya A, Ünal N, Özbeyaz C, Dinç R (2026).** Morphometric Identification of Gemlik Horse and Crossbreds. *Van Vet J*, 37(1), 92-97.
- Langer P (1987).** Evolutionary patterns of Perissodactyla and Artiodactyla (Mammalia) with different types of digestion. *J Zool Syst Evol Res*, 25(3), 212-236.
- MacLaren JA, Nauwelaerts S (2016).** A three-dimensional morphometric analysis of upper forelimb morphology in the enigmatic tapir (Perissodactyla: Tapirus) hints at subtle variations in locomotor ecology. *J Morphol*, 277(11), 1469-1485.
- Medici EP, Mezzini S, Fleming CH, Calabrese JM, Noonan MJ (2022).** Movement ecology of vulnerable lowland tapirs between areas of varying human disturbance. *Mov Ecol*, 10(1), 14.
- Mendoza FJ, Toribio RE (2025).** An overview of donkey neonatology. *Anim*, 15(13), 1986.
- O'Connell-Rodwell CE, Wood JD, Rodwell TC et al. (2006).** Wild elephant (*Loxodonta africana*) breeding herds respond to artificially transmitted seismic stimuli. *BES*, 59(6), 842-50.
- Paksoy Y (2016).** İngiliz Atlarında Vücut Ölçülerinin Yarış Performansına Etkileri. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Zooteknik Anabilim Dalı Doktora Tezi.

- Paksoy Y, Arslan D (2023).** Lama yetiştiriciliğine ilişkin bilgiler ve öneriler. *Antakya Vet Bil Derg*, 2(2), 76-84.
- Paksoy Y, Koluman A (2025).** Probiotics in Horse Nutrition. *OKÜ Fen Bil Ens Derg*, 8(4), 1993-2005.
- Payne RC, Hutchinson JR, Robilliard JJ, Smith NC, Wilson AM (2005).** Functional specialisation of pelvic limb anatomy in horses (*Equus caballus*). *J Anat*, 206(6), 557-574.
- Prinsloo ND, Postma M, Nico de Bruyn PJ (2021).** How unique is unique? Quantifying geometric differences in stripe patterns of Cape Mountain zebra, *Equus zebra zebra* (Perissodactyla: Equidae), *Zool J Linn Soc*, 191(2), 612-625.
- Rose RJ, Hodgson DR (2007).** Klinik Pratikte At Hekimliği. Medipres Yayıncılık.
- Sneddon JC, Argenzio RA (1998).** Feeding strategy and water homeostasis in equids: the role of the hind gut. *J Arid Environ*, 38(3), 493-509.
- Sikandar A (2020).** Morphophysiological Study of Gastrointestinal Tract of the Donkey (*Equus asinus*). *Equine Sci*, 1, 119.
- Steiner CC, Ryder OA (2011).** Molecular phylogeny and evolution of the Perissodactyla. *Zool J Linn Soc*, 163(4), 1289-1303.
- Tougaard C, Delefosse T, Hänni C, Montgelard C (2001).** Phylogenetic Relationships of the Five Extant Rhinoceros species (Rhinocerotidae, Perissodactyla) Based on Mitochondrial Cytochrome b and 12S rRNA gene. *Mol Phylogenet Evol*, 19(1), 34-44.
- Openlearn (2026).** Studying mammals: Plant predators. Hindgut fermenters. Erişim Tarihi: 10 Nisan 2026. Erişim Adresi: <https://www.open.edu/openlearn/natureenvironment/natural-history/studying-mammals-plant-predators/content-section-5>. 3
- Wilson DE, Reeder DM (2005).** Mammal Species of the World. 3. Ausgabe. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, ISBN 0-8018-8221-4.
- Yılmaz S, Özbilen A (2011).** Hayvanat Bahçeleri Tasarım İlkeleri ve Tipolojileri. *SDÜ Orman Fak Derg*, 12, 47-56.
- Yıldırım F (2019).** The effect of some environmental factors to race performance of purebred arabian horses. *Kocatepe Vet J* 12(1), 1-6.
- Zaneb H, Peham C, Stanek C (2013).** Functional anatomy and biomechanics of the equine thoracolumbar spine: a review. *Turk J Vet Anim Sci*, 37(4), 380-389.
- Zerek A, Erdem İ, Yaman M (2024).** A Case of Traumatic Myiasis Caused by *Wohlfahrtia magnifica* (Schiner 1862) (Diptera: Sarcophagidae) in a Colt (*Equus asinus*). Olgu Sunumu. *Antakya Vet Bil Derg*, 3(1), 12-15.
- Zimmerman DM, Hernandez S (2015).** In book: Tapiridae. Miller RE, Fowler ME (Ed). Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine (pp. 547-559) Saunders, Canada.



Mardin Yöresindeki Rahvan Atlarda Hematolojik Parametrelerin Referans Aralıklarının Belirlenmesi (2025). Van Vet J, 36(3), 261-264.

Zarife DEĞER ULUĞBEY^{1,*} Ömer Faruk KATANALP¹ Almina GÜNEŞ¹ Münir OCAK¹
Hasan İÇEN¹

¹ Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, 21280, Diyarbakır, Türkiye

Düzeltilme:

Van Veterinary Journal dergisinin 2025 yılı 36. cilt 1. sayısının 261-264. sayfalarında yayımlanan "**Mardin Yöresindeki Rahvan Atlarda Hematolojik Parametrelerin Referans Aralıklarının Belirlenmesi**" başlıklı makalede Münir OCAK adlı yazarın ORCID ID bilgisi, yazar tarafından sehven hatalı bildirilmiştir. Bu hata, yazar tarafından aşağıda verilen düzeltme metni ile düzeltilmiştir.

Original Article URL: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/5221657>

Original Article DOI: <https://doi.org/10.36483/vanvetj.1779668>

Determination of Reference Intervals of Haematological Parameters in Rahvan Horses of the Mardin Region (2025). Van Vet J, 36(3), 261-264.

Corrigendum:

The article titled "**Determination of Reference Intervals of Haematological Parameters in Rahvan Horses of the Mardin Region**" published on pages 261-264 of 2025-year, Volume 36, Issue 3 of the Van Veterinary Journal, the ORCID ID of the author Münir OCAK was inadvertently reported incorrectly by the author. The author has corrected this error with the corrigendum text provided below.

Orijinal Makale URL: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/5221657>

Orijinal Makale DOI: <https://doi.org/10.36483/vanvetj.1779668>

CORRIGENDUM TEXT

Corrected ORCID ID:

Münir OCAK

<https://orcid.org/0009-0008-2587-2493>

