

ISSN: 1306-6137
e-ISSN: 2147-9615



**Atatürk Üniversitesi
Veteriner Bilimleri Dergisi**

**Atatürk University
Journal of Veterinary Sciences**

<http://dergipark.gov.tr/ataunivbd>

Yıl/Year: 2017

Cilt/Volume: 12

Sayı/Number: 2

ISSN: 1306-6137
e-ISSN: 2147-9615

**Atatürk Üniversitesi
Veteriner Bilimleri Dergisi**

**Atatürk University
Journal of Veterinary Sciences**

<http://dergipark.gov.tr/ataunivbd>

Ekim / October

Yıl/Year: 2017

Cilt/Volume: 12

Sayı/Number: 2



ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER BİLİMLERİ DERGİSİ

ISSN: 1306 – 6137 / e-ISSN: 2147 - 9615

ATATÜRK UNIVERSITY
JOURNAL OF VETERINARY SCIENCE



ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ ADINA SAHİBİ / OWNER

Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM

YAYIN KURULU / EDITORIAL BOARD

Baş Editör / Editor-in-Chief
Doç. Dr. Mustafa Sinan AKTAŞ

Editör / Editor
Prof. Dr. Ekrem LAÇIN

Editör Yardımcıları / Associate Editors

Prof. Dr. Ömer ÇOBAN
(İstatistik Editörü / Statistical Editor)

Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Serkan EROL
(Bölüm Editörü / Section Editor)

Doç. Dr. Özgür Kaynar
(Bölüm Editörü / Section Editor)

Yrd. Doç. Dr. Serkan YILDIRIM
(Bölüm Editörü / Section Editor)

Yrd. Doç. Dr. Elif DOĞAN
(Bölüm Editörü / Section Editor)

Yrd. Doç. Dr. Serdar ALTUN
(Bölüm Editörü / Section Editor)

YAYIN KURULU ÜYELERİ / EDITORIAL BOARD MEMBERS

Dr. Mustafa Atasever, TÜRKİYE / TURKEY

Dr. Ardita Jahja-Hoxha, KOSOVA / KOSOVO

Dr. Zekai Halıcı, TÜRKİYE / TURKEY

Dr. Daniel Zahner, ALMANYA / GERMANY

Dr. Mustafa Alisharlı, TÜRKİYE / TURKEY

Dr. Eva Voslarova, ÇEK CUMHURİYETİ / CZECH REPUBLIC

Dr. Aleksandra Gorecka-Bruzda, POLONYA / POLAND

Dr. Tanvir Rahman, BANGLADEŞ / BANGLADESH

İngilizce Danışmanı
English Adviser

Arş. Gör. Çiğdem SEVİM

Sekreteryaya ve Web Tasarım
Secretariat and Web Design

Yrd. Doç. Dr. Serdar ALTUN

Dizgi
Typesetter

Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Serkan EROL

Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., ulusal hakemli bir dergi olup Nisan, Ekim ve Aralık aylarında olmak üzere yılda 3 kez yayımlanır. Bu dergi, **ELSEVIER-Scopus**, **CAB Abstract**, **CABI full text**, **EBSCO**, **TÜBİTAK-ULAKBİM-Yaşam Bilimleri Veritabanı** ve **Türkiye Atıf Dizini** tarafından taranmaktadır.

Atatürk University J. Vet. Sci., is a refereed national journal, is published tri-annually in April, October and December. This journal is abstracted in **ELSEVIER-Scopus**, **CAB Abstract**, **CABI full text**, **EBSCO**, **TUBİTAK-ULAKBİM-Life Science Database** and **Türkiye Citation Index**.

Yazışma Adresi / Correspondence Address

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Bilimleri Dergisi Editörlüğü, 25240, Kampüs
Erzurum / TÜRKİYE

Tel : +90 442 2317222, Fax: +90 442 2317244

E-posta: atavetderg@atauni.edu.tr; vetdergisi@atauni.edu.tr

Yıl / Year: 2017

Cilt / Volume: 12

Sayı / Number: 2

Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., 2017; 12(2)

Bu Sayının Hakem ve Danışman Listesi / List of Referees and Advisors for This Issue

- Prof. Dr. Abuzer TAŞ, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Alkan KAMİLOĞLU, Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Arif KURTDEDE, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Dursunali ÇINAR, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Fikret ÇELEBİ, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Hasan ÖZEN, Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU, Atatürk Üniversitesi, Erzurum Meslek Yüksek Okulu, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. İsmail KAYA, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Meryem EREN, Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Mete CİHAN, Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Miyase ÇINAR, Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Murat SARIERLER, Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Mustafa İSSİ, Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Sulhattin YAŞAR, Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Zafer BULUT, Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. Başak HANEDAN, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. Gülay ÇİFTÇİ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. Gülşah ÇANAKÇI ADIGÜZEL, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. Levent ALTINTAŞ, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. Mesut Bünyami HALICI, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. Seyda CENGİZ, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, TÜRKİYE.
- Yrd. Doç. Dr. Akın KIRBAŞ, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, TÜRKİYE.
- Yrd. Doç. Dr. Emin ŞENGÜL, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, TÜRKİYE.
- Yrd. Doç. Dr. Güngör Çağdaş DİNÇEL, Aksaray Üniversitesi, Eksil Meslek Yüksekokulu, TÜRKİYE.
- Yrd. Doç. Dr. Hakan AYDIN, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, TÜRKİYE.
- Yrd. Doç. Dr. Şebnem PAMUK, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, TÜRKİYE.

* Hakem listesi akademik unvan ve isme göre alfabetik olarak sıralanmıştır.

▶ Vural DENİZHAN, Süleyman KOZAT, Cumali ÖZKAN, Selçuk Seçkin TUNCER. Evaluation of Serum Cobalt, Copper, Iron, Calcium, Phosphorus and Magnesium Concentrations in Cattle Naturally Infected with <i>Theileria annulata</i> (<i>Theileria annulata</i> ile Doğal Enfekte Sığırlarda Serum Kobalt, Bakır, Demir, Kalsiyum, Fosfor ve Magnezyum Konsantrasyonlarının Değerlendirilmesi)	111-117
▶ Ali Evren HAYDARDEDEOĞLU, Buğrahan Bekir YAĞCI, Kerem URAL, Hasan GÜZELBEKTEŞ. Stress Responses of Stallions during Transport Period: The variations of Complete Blood Count and Serum Biochemistry (<i>Uzun Transporta Bağlı Aygırların Strese Tepkileri: Tam kan sayımı ve Serum Biyokimya Varyasyonları</i>)	118-123
▶ Latif Emrah YANMAZ, Elif DOĞAN, Zafer OKUMUŞ, Mümin Gökhan ŞENOCAK, Uğur ERSÖZ, Sitkican OKUR. Comparison of Intranasal and Intramuscular Administration of Zolazepam-Tiletamine Combination in Cats (<i>Kedilerde İntranasal ve İntramusküler Zolazepam-Tiletamine Kombinasyonu Uygulamasının Karşılaştırılması</i>)	124-129
▶ Emin ŞENGÜL, Fikret ÇELEBİ, Volkan GELEN, Ali ÇINAR. The Effects of <i>Rosmarinus officinalis</i> (Rosemary) Aqueous Extract on Smooth Muscle Contractions in Isolated Rat Urinary Bladder (<i>İzole Edilmiş Rat Mesane Düz Kas Kontraksiyonları Üzerine Rosmarinus officinalis (Rosemary) Aköz Ekstraktının Etkileri</i>)	130-136
▶ Ebru ÇETİN. Sıçanlarda Karbon Tetraklorürün (CCl ₄) Neden Olduğu Koagülasyon Bozukluklarında Etil Pirüvatın Etkisi (<i>Effect of Ethyl Pyruvate on Carbon Tetrachloride (CCl₄)-Induced Coagulation Disturbances in Rats</i>)	137-142
▶ Nadide Nabil KAMİLOĞLU, Yeliz KOLAY. L-Name Hipertansif Ratlarda Ace İnhibitörü ile Birlikte L-Karnitin ve Co-Enzim Q ₁₀ Verilmesinin Total Oksidan ve Antioksidan Düzeyleri Üzerine Etkileri (<i>Effects of L-Carnitine and Co-enzyme Q10 Together with ACE Inhibitors on Total Oxidant and Antioxidant Levels in L-Name Hypertensive Rats</i>)	143-151
▶ Ayşe KILIÇ. Koyun ve Keçi Sütlerinde <i>Coxiella burnetii</i> Varlığının PCR ile Araştırılması (<i>The Investigation of Presence Coxiella burnetii in Sheep and Goat Milk by the PCR</i>)	152-156
▶ M.Kuddusi ERHAN, Ş.Canan BÖLÜKBAŞI AKTAŞ. Narenciye Kabuk Yağlarının Etlik Piliçlerde Doku Yağ Asidi Kompozisyonu ve Raf Ömrü Üzerine Etkileri (<i>The Effects of Citrus Peel Oils on Fatty Acid Composition and Shelf Life of Muscle in Broilers</i>)	157-166
▶ Fatih Mehmet KANDEMİR, Sefa KÜÇÜKLER, Cüneyt ÇAĞLAYAN. Ratlarda Methotrexate Kaynaklı Karaciğer Toksisitesine Karşı Silymarin ve Naringin'in Yararlı Etkileri (<i>Beneficial Effects of Silymarin and Naringin Against Methotrexate-induced Hepatotoxicity in Rats</i>)	167-177
▶ Serkan YILDIRIM. Ratlarda Karbon Tetraklorür ile İndüklenen Karaciğer Toksikasyonu Üzerine Resveratrol'ün Koruyucu Etkisinin Histopatolojik ve TUNEL Metodu ile Araştırılması (<i>Investigation by Histopathological and TUNEL Method of the Protective Effect of Resveratrol on Carbon Tetrachloride Induced Liver Toxicity in Rats</i>)	178-186
▶ Serpil KILIÇ, Fikret KARATAŞ. Van Kedisi Eritrositi'nden 6-Fosfogluconat Dehidrogenaz Enzimi (E.C. 1.1.1.44)'nin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Kinetik Özellikleri (<i>Purification, Characterisation and Kinetic Properties of 6-Phosphogluconate Dehydrogenase Enzyme (E.C. 1.1.1.44) from the Van Cat Erythrocyte</i>)	187-194
Olgu Sunumları / Case Reports	
▶ Zafer USTA, Ottmar DISTL. Atresia Ani, Hypospadi and Rudimentary External Genitalia in Two German Holstein Calves (<i>İki Alman Holştayn Buzağında Atresia Ani, Hypospadi ve Gelişmemiş Dış Genital Organlar Olgusu</i>)	195-202
Derlemeler / Reviews	
▶ Duygu SEZER, Özlem GÜZEL. Kaplumbağalarda Endoskopi Uygulamaları (<i>Endoscopic Applications in Turtles</i>)	203-209
▶ Süleyman KOZAT. Sıvı Tedavisinde Kolloidal Solüsyonların Önemi (<i>Importance of Colloidal Solutions in Fluid Treatment</i>)	210-217
▶ Kemal Kaan TEKİNŞEN, Danış AKAR. Erzincan Tulum Peyniri (<i>Erzincan Tulum Cheese</i>)	218-226



Evaluation of Serum Cobalt, Copper, Iron, Calcium, Phosphorus and Magnesium Concentrations in Cattle Naturally Infected with *Theileria annulata*

Vural DENİZHAN¹, Süleyman KOZAT²✉, Cumali ÖZKAN², Selçuk Seçkin TUNCER¹

1. Yuzuncu Yil University, High Vocational of Ozalp, Van, TURKEY.

2. Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Van, TURKEY.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
14.06.2016	13.02.2017	30.10.2017

Abstract: The purpose of this study was to evaluate serum albumin, glucose, calcium (Ca), cobalt (Co), copper (Cu), iron (Fe), magnesium (Mg), and phosphorus (P) in cows with naturally infected with *Theileria annulata*. The material of this study was a total of 15 cattle with different ages, breeds and genders diagnosed as theileriosis according to clinical and microscopical examination. According to statistical analyses of biochemical parameters; serum glucose, Ca, Co, Cu, Fe, Mg, and P concentrations were detected significantly low in cattle with theileriosis ($P<0.001$). In conclusion; mineral substance levels were altered in cattle naturally infected with *Theileria annulata*. Additionally to the classical treatment of theileriosis, administering mineral supplements including Ca, Co, Fe, Cu, Mg, and P to the animals is thought to be more useful in treatment.

Keywords: Cattle, Mineral substance, *Theileria annulata*.

Theileria annulata ile Doğal Enfekte Sığırlarda Serum Kobalt, Bakır, Demir, Kalsiyum, Fosfor ve Magnezyum Konsantrasyonlarının Değerlendirilmesi

Öz: Bu çalışmanın amacı, doğal *Theileria annulata* ile enfekte sığırlarda serum albümin, glikoz, Kalsiyum (Ca), kobalt (Co), bakır (Cu), demir (Fe), Magnezyum (Mg) ve Fosfor düzeylerini değerlendirmektir. Bu çalışmanın hayvanın materyali olarak klinik ve mikroskopik inceleme sonuçlarına göre theileriosis tanısı konulan değişik yaş, ırk ve cinsiyette 15 sığır kullanıldı. Biyokimyasal parametrelerin istatistiki analizine göre serum glikoz, Ca, Co, Cu, Fe, Mg ve P konsantrasyonları theileriosisli sığırlarda önemli düzeyde düşük tespit edildi ($P<0.001$). Sonuç olarak; Doğal *Theileria annulata* ile enfekte sığırların mineral madde düzeyleri değişmektedir. Theileriosisin klasik tedavisine ek olarak Ca, Co, Fe, Cu, Mg ve P içeren mineral preparatların verilmesinin tedavide daha faydalı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Mineral madde, Sığır, *Theileria annulata*.

INTRODUCTION

Bovine tropical theileriosis caused by *Theileria annulata*, is a tick-borne disease of cattle. Theileria disease is important disease that is widespread in tropical and subtropical climates countries caused morbidity and loss of productivity in indigenous cattle and lethal disease in imported high-grade cattle and crossbred stock (1-4).

Macro and micronutrients are inorganic substances essential to maintain the normal function and living status in domestic animals. These nutrients play a critical role in physiological processes related to health, growth and reproduction, and the adequate function of the immune and endocrine systems (5). Cobalt is the main component of vitamin B₁₂ which plays an important role in energy metabolism, haematological parameters and amino acid metabolism (6-8). Cobalt has been used for years to prevent unproductiveness with signs of anorexia, low body weight gain, emaciation, low milk yield and anaemia (7). It is reported that there is closely between Concentration copper (Cu) and health in the cows (9). Copper is a compound of enzyme catalysts and participates in important biochemical function (6). Copper is responsible for activation of numerous vital enzyme and its deficiency causes various disorders (8). Iron (Fe) is essential to virtually s as a component of hemoglobin and numerous other iron-containing proteins in the body. Fe deficiency caused the incidence of infectious diseases and impairment of the activities of iron-containing enzymes in cells of the immune system in animals (10). Magnesium (Mg) is an important mineral for in animals. Mg should be sufficient to metabolic activity and protect animal health (11). In cattle with theileriosis, there were decreased serum calcium and phosphorus concentrations in cattle infected with *T. annulata* in the present study which was also decreased in the previous studies (12). Col and Uslu (13) reported that hypocalcaemia in their study could be due to hypoproteinemia, decreased dietary intake,

intestinal malfunction and kidney damage. The decreased phosphorus serum concentration could be due to diarrhea and renal wasting (14). Recent reviews have focused on the role of trace minerals in disease resistance in ruminants (5-7). The purpose of this study is to present changes in serum mineral concentrations in cattle with theileriosis before and after treatment, and importance of these concentration changes in treatment and prognosis of the disease.

MATERIALS and METHODS

Animal selection and blood collection

The material of this study was a total of 15 cattle with different ages, breeds and genders diagnosed as theileriosis according to clinical and microscopical examination and 10 healthy cattle as control group. All animals in the study adhered to the principle of local Ethics Committee (Date and decision of the ethics report: 01.08.2013 and 2013/08). Clinical findings of the animals were evaluated systemically before treatment and at the 7th day after treatment. In order to perform microscopical examination, blood samples were obtained from V. auricularis before and after treatment and blood smears were prepared and stained with Giemsa. Patients with piroplasm form of theileria in their erythrocytes were evaluated as positive.

Blood samples were obtained from V. jugularis before and at the 7th day of treatment and for once from the control group for haematological and biochemical analyses. In order to perform hematological analyses, blood samples were obtained to tubes containing EDTA and to perform biochemical analyses, serum was extracted from blood samples obtained to anticoagulant free tubes which were centrifuged on 3000 RPM (Rotofix 32 – Hettich). Obtained serum samples were preserved in -20 °C until evaluation. Single dose of buparvaquon (Butalex – Ceva DiF) were administered to infected

animals with dose of 2.5 mg/kg live weight. Oxytetracyclin (Geosol injectable solution/VETAŞ Turkey) was administered for 5 days intramuscularly in order to prevent secondary infections.

Hematological and Biochemical Examination

Hematocrit (Hct), hemoglobin (Hb) concentration and White Blood Cell amount (WBC) were measured with hemogram device (QBC vetautoreader® – Idexx). Serum Cobalt (Co), Copper (Cu), Phosphorus (P), Iron (Fe), Calcium (Ca) and Magnesium concentrations were measured with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (ICP-MS) (Thermo Scientific, Designed in UK and Made in China). Serum glucose concentrations were measured spectrophotometrically (Photometer 5010 – Boehringer Mannheim) according to the test procedures.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 20 for Windows. Clinical signs, hematological and biochemical parameters were stated as Mean, Standard Deviation, Minimum and Maximum values. Kruskal-Wallis test was performed for comparing these attributes. Spearman-correlation coefficient was calculated in order to determine the relation between parameters in each group. Statistically significance level was taken as 5 %.

RESULTS

Clinical Findings

The clinical examinations of cattle with theileriosis; anorexia, dullness, swelling in superficial lymph nodes, hyperemia in visible mucosa and conjunctivas were observed. Anemia and petechial hemorrhage were observed in certain animals (Table1).

Table1. Clinical findings in healthy cattle and cattle infected with *Theileria annulata*.

Tablo 1. Sağlıklı ve *Theileria annulata* ile enfekte sığırlarda klinik bulgular.

Parameters	Control n=10 $\bar{X} \pm SD$	Before treatment n=15 $\bar{X} \pm SD$	7th day After Treatment n=15 $\bar{X} \pm SD$
Body Temperature (°C)	38.32±0.12 ^a	40.26±0.26 ^d	38.36±0.10 ^a
Heart Rate (beat /min)	73.50±1.20 ^a	84.30±4.48 ^c	80.32±3.05 ^a
Respiratory Rate (breath / min)	27.50±0.56 ^a	43.30±1.84 ^b	35.48±1.38 ^d

Importance of statistical difference in the same lines were determined as ab: P<0.001, ac: P<0.01 ve ad: P<0.05.

Hematological Findings

Hemoglobin concentration, hematocrite and total leucocyte amount were significantly lower in cattle suffering from theileriosis than in the healthy controls (P<0.001). Despite treatment, while

hematological parameters of cattle with theileriosis were detected close to same hematological parameters of healthy cattle; Htc and WBC values were detected statistically lower than healthy cattle (P<0.01 and P<0.05, respectively) (Table 2).

Table 2 Hematological findings in healthy cattle and cattle with Theileriosis.**Tablo 2.** Sağlıklı ve Theileriozisli sığırlarda hematolojik bulgular.

Parameters	Control n=10 $\bar{X} \pm SD$	Before treatment n=15 $\bar{X} \pm SD$	7th day After Treatment n=15 $\bar{X} \pm SD$
Hemoglobin concentration (g/dl)	11.14±0.24 ^a	7.12±0.54 ^b	9.86±0.24 ^a
Hematocrit (%)	33.10±0.58 ^a	16.22±0.40 ^b	26.84±0.32 ^c
Total Leucocyte Count ($\times 10^9/L$)	8.88±0.42 ^a	5.10±0.44 ^b	7.22±0.82 ^d

Importance of statistical difference in the same lines were determined as **ab**: P<0.001, **ac**: P<0.01 ve **ad**: P<0.05.

Biochemical Findings

There is a decrease in serum albumin concentrations in the cattle infected with *T. annulata*. There was, however, no significant difference in the albumin ratio between infected and healthy cattle (P>0.05). Serum glucose, P, Ca, Co, Fe, Cu and Mg concentrations in cattle with theileriosis

were detected significantly lower than control group before treatment (P<0.001). Despite the treatment; serum glucose (P<0.01), Co (P<0.01), Cu (P<0.01), Fe (P<0.05), Mg (P<0.01) and P (P<0.01) concentrations were detected lower in cattle with theileriosis at the 7th day of treatment than the same parameters of control group (Table 3).

Table 3 Biochemical parameters in healthy cattle and cattle with Theileriosis.**Tablo 3.** Sağlıklı ve Theileriozisli sığırlarda biyokimyasal parametreler.

Parameters	Control n=10 $\bar{X} \pm SD$	Before treatment n=15 $\bar{X} \pm SD$	7th day after treatment n=15 $\bar{X} \pm SD$
Glucose (mg/dl)	72.32±6.70 ^a	46.24±7.27 ^b	62.41±4.34 ^c
Albumin (gr/dl)	2.82±0.25 ^a	2.66±0.32 ^a	2.70±0.34 ^a
Ca (mg/dl)	8.21±2.30 ^a	4.50±1.63 ^b	7.78±0.68 ^a
Co ($\mu g/L$)	51.36±4.10 ^a	20.44±2.10 ^b	46.76±3.66 ^c
Cu ($\mu g/L$)	1130.50±246.43 ^a	528.62±61.16 ^b	858.75±115.56 ^c
Fe (mg/L)	1.70±0.35 ^a	0.41±0.17 ^b	1.14±0.22 ^d
Mg (mg/dl)	2.57±0.25 ^a	1.26±0.34 ^b	1.87±0.16 ^c
P (mg/dl)	6.30±0.68 ^a	2.605±0.52 ^b	4.51±0.56 ^c

Importance of statistical difference in the same lines were determined as **ab**: P < 0.001, **ac**: P < 0.01 ve **ad**: P < 0.05.

DISCUSSION and CONCLUSION

Significant changes in cattle infected with *Theileria annulata* were reported in several studies (3, 13-16). In the present study; RBC count, PCV and Hb concentration in cattle with theileriosis were significantly lower than healthy ones (P<0.05). With progression of parasitemia severity, a significant decrease in RBC count, PCV and Hb concentration was observed (P<0.05). These findings were similar to those of many researchers (3,15,16). The decline in RBC count, PCV and Hb concentration can also be

attributed to multiplication of piroplasms in RBC which results in erythrolysis (2).

In the present study, there was a decrease in serum glucose concentrations in cattle infected with *T. annulata* compared with control group. The findings were in accordance with the findings of researchers (13,14) as they reported the decreased serum glucose concentration could be due to glucose utilization in blood and hepatic dysfunction as a result of theileria infection. Kincaid and colleagues (17) reported the low serum total protein

concentration in cattle naturally infected with *T. annulata* was possible because of hypoalbuminemia and hypoglobulinemia resulting from liver failure and severe lymphocytopenia. In current study serum albumin concentration in infected with *T. annulata* were found to be numerically lower concentrations of healthy cattle.

The decreased serum copper and iron concentrations in *Theileria*-infected cattle could be attributed to the inability of the damaged liver to synthesize ceruloplasmin and transferrin, respectively (12). In this study, serum Fe and Cu concentrations were detected significantly lower than control group ($P < 0.001$). Copper has roles on superoxide dismutase and cytochrome oxidase, myelin synthesis and keratinisation (18). Cytochrome C oxidase enzyme which has important function in energy conversion is dependent on copper (19). Therefore copper is an essential element and primarily has role in carbohydrate metabolism (6). Researchers (19) reported plasma Cu concentrations as 90-150 $\mu\text{g}/\text{dl}$ for ruminants. In this study; serum Cu levels in healthy cattle were determined as $1130.50 \pm 246.43 \mu\text{g}/\text{L}$. Before treatment, serum Cu levels in cattle with theileriosis were determined as $528.62 \pm 61.16 \mu\text{g}/\text{L}$. At the 7th day after treatment, serum Cu level in theileriosis was $858.75 \pm 115.56 \mu\text{g}/\text{L}$. Copper has roles on growth, regulating the reproduction and carbohydrate metabolism. Decrease in food intake resulted by anorexia lead to impairment of carbohydrate metabolism (6,9,18,19) is also thought to cause decrease in Cu levels in cattle with theileriosis.

In this study; before treatment, while average serum calcium concentrations were detected lower in cattle with theileriosis than control group; serum albumin level did not change. Decreased calcium concentrations in theileriosis could be resulted from decreased dietary intake, intestinal malfunction, kidney damage and decreased phosphorus concentration due to diarrhea and renal wasting (12,13).

Mg has great impact on basic metabolic rate in fat and carbohydrate metabolism, and blood glucose regulation (20). Serum magnesium concentration of healthy cattle is reported as 1.2-3.5 mg/dl (21). In the current study; when Mg levels of cattle with theileriosis before treatment were compared with control group; Mg levels in bovine with theileriosis was found lower ($P < 0.001$). In this study; the reasons of lower magnesium concentration are thought as increase in tubular resorption and loss of appetite due to gastrointestinal atony.

Serum phosphorus level in healthy cattle is reported as 5.6-6.5 mg/dl . As reported, low food intake by these factors lead to phosphorus deficiency (22). Hypophosphataemia causes various clinical findings such as anorexia, pica, muscle weakness, intravascular haemolysis impaired liver function (23).

In this current study, the serum phosphorus concentrations were significantly lower in cattle suffering from theileriosis than in the healthy controls ($P < 0.01$). It has been postulated that the lower level of phosphorus amount in cows with theileriosis could partly be due to the anorexia condition prevailing in the disease. These data support the researchers' data (22,23). In the study, the decrease in the concentration of Mg and P in cattle with theileriosis can be caused diarrhoea and wasting (12).

In conclusion; serum Ca, Co, Cu, Fe, Mg and P concentrations in cattle with *Theileria annulata* were detected low before treatment. Additionally to the classical treatment of theileriosis, administering mineral supplements to the animals is thought to be more useful in treatment. Therefore there should be more studies performed about the contribution of minerals to the treatment of theileriosis. This study will provide an insight to the studies will be performed in this respect.

REFERENCES

1. Robinson PM., 1982. *Theileria annulata* and its transmission — a review. *Trop Anim Health Prod*, 14, 3-12.

2. Singh S., Khatri N., Manuja A., Sharma RD., Malhotra DV., Nichani AK., 2001. Impact of field vaccination with *Theileria annulata* schizont cell culture vaccine on the epidemiology of tropical theileriosis. *Vet Parasitol*, 101, 91-100.
3. Khalil B., Khodadad M., Pourjafar M., Mohsen G., Ebadolah M., 2011. Serum thyroid hormones and trace element concentrations in crossbred holstein cattle naturally infected with *Theileria annulata*. *Comp Clin Pathol*, 20, 115-120.
4. Alim MA., Das S., Roy K., Masuduzzaman M., Sikder S., Hassan MM., Hossain MA., 2012. Prevalence of hemoprotozoan diseases in cattle population of chittagong division, Bangladesh. *Pak Vet J*, 32, 221-224.
5. Djokovic RD., Kurcubi VS., Ilic ZZ., 2014. Blood serum levels of macro-and micronutrients in transition and full lactation cows. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20, 715-720.
6. Kozat S., 2006. Importance, necessity and the effects of deficiencies of trace elements in ruminants. *J Health Sci*, 9, 58-67.
7. Kincaid RL., Lefebvre LE., Cronrath JD., Socha MT., Johnson AB., 2003. Effect of dietary cobalt supplementation on cobalt metabolism and performance of dairy cattle. *J Dairy Sci*, 86, 1405-1414.
8. Kozat S., Mert H., Yüksek N., Mert N., Ekin S., 2007. Serum levels of some trace elements and thyroid hormones in yearling rams with retardation in growth. *Bull Vet Inst Pulawy*, 51, 117-120.
9. Zhang Z., Liu G., Li X., Gao L., Guo C., Wang H., Wang Z., 2010. Evaluation of the change of serum copper and zinc concentrations of dairy cows with subclinical ketosis. *Biol Trace Elem Res*, 138, 8-12.
10. Kozat S., Yüksek N., Goz Y., Keleş I., 2006. Serum iron, total iron-binding capacity, unbound iron-binding capacity, transferrin saturation, serum copper, and hematological parameters in pregnant Akkaraman ewes infected with gastrointestinal parasites. *Turk J Vet Anim Sci*, 30, 601-604.
11. Schonewille JTh., 2013. Magnesium in dairy cow nutrition: an overview. *Plant and soil*, 368, 167-178.
12. Omer OH., El-Malik KH., Magzoub M., Mahmoud OM., Haroun EM., Hawas A., Omar HM., 2003. Biochemical profiles in Friesian cattle naturally infected with *Theileria annulata* in Saudi Arabia. *Vet Res Commun*, 27, 15-25.
13. Col R., Uslu U., 2007. Changes in selected serum components in cattle naturally infected with *Theileria annulata*. *Bull Vet Inst Pulawy*, 51, 15-18.
14. Khan IA., Khan A., Hussain A., Riaz A., Aziz A., 2011. Hemato-biochemical alterations in cross bred cattle affected with bovine theileriosis in semi arid zone. *Pak Vet J*, 31, 137-140.
15. Nazifi S., Razavi SM., Esmailnejad Z., Gheisari H., 2009. Study on acute phase proteins (haptoglobin, serum amyloid A, fibrinogen, and ceruloplasmin) changes and their diagnostic values in bovine tropical theileriosis. *Parasitol Res*, 105, 41-46.
16. Ramin AG., Asri-Rezaie S., Hemati M., Eftekhari Z., Jeloudary M., Ramin S., 2011. Evaluation of the erythrocytes and leucocyte alterations in cows infected with *Theileria Annulata*. *Acta Vet (Beograd)*, 61, 567-574.
17. Kincaid RL., Lefebvre LE., Cronrath JD., Socha MT., Johnson AB., 2003. Biochemical profiles in friesian cattle naturally infected with theileria annulata in saudi arabia. *Vet Res Commun*, 27, 15-25.
18. Cintia PG., Leonardo M., Israel ORW., Andrea S., Beatriz VL., Elena DM., 2015. Superoxide dismutase activity, hydrogen peroxide steady-state concentration, and bactericidal and phagocytic activities against *Moraxella bovis*, in neutrophils isolated from copper-deficient bovines. *Biol Trace Elem Res*, 171, 94-100.
19. Kaneko JJ., 1989. Iron metabolism and its disease. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 4th ed., 256-273, Academic Press, New York.
20. Zhang Z., Li X., Wang H., Guo C., Gao L., Liu L., Li

- Y., 2011. Concentrations of sodium, potassium, magnesium, and iron in the serum of dairy cows with subclinical ketosis. *Biol Trace Elem Res*, 144, 525-528.
21. Rosol TJ., Capen CC., 1997. Calcium-regulating hormones and diseases of abnormal mineral (calcium, phosphorus, magnesium) metabolism. In, Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (Ed): *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 15th ed., 674-687, Academic Press, California.
22. Kennerman E., 2011. Metabolic profile test in dairy cows. *Turkiye Klinikleri J Vet Sci*, 2, 96-101.
23. Grünberg W., 2008. Phosphorus homeostasis in dairy cattle: some answers, more questions. *Proceedings of the 17th Annual Tri-State Dairy Nutrition Conference*, 22-23 April, Fort Wayne, Indiana, USA.



Stress Responses of Stallions During Transport Period: The Variations of Complete Blood Count and Serum Biochemistry*

Ali Evren HAYDARDEDEOĞLU¹, Buğrahan Bekir YAĞCI², Kerem URAL³, Hasan GÜZELBEKTEŞ⁴

1. Aksaray University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Aksaray, TURKEY.
2. Kırıkkale University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Kırıkkale, TURKEY.
3. Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Aydın, TURKEY.
4. Selçuk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Konya, TURKEY.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
19.08.2016	21.02.2017	30.10.2017

Abstract: In the present study the objective was to determine the effect of one transport journey on some stress indicators in horses. 11 adult stallion (all stallion) age 3-12 years including 7 Thoroughbred, 2 Arabian, 1 Dutch Warmblood, and 1 Friesian were enrolled. White blood cell counts and other relevant parameters were determined by an automated cell counter before and after transportation. Serum activities of relevant biomarkers were determined by use of an autoanalyzer. Serum cortisol level was detected by a microplate immunoassay technique. Sodium (Na), Potassium (K) and Chlor (Cl) and Calcium (Ca) levels were also measured by use of autoanalyser. Mean Platelet (PLT), and Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) White Blood Cell (WBC) counts did not exhibit a variation for healthy horses during the study whereas RBC, Hb and Hct levels exhibited significant increases after transportation ($P < 0.05$). Mean daily glucose concentration showed an increase after transportation ($P < 0.05$). Mean total protein, albumin, AST and CK levels presented increases on day 2, after transportation ($P < 0.05$). Mean blood urea nitrogen, creatinine, total bilirubin, ALT, ALP, LDH and GGT did not show significant changes throughout the study. Mean Sodium (Na), Potassium (K) and Chlor (Cl) levels showed alterations after transportation ($P < 0.05$), whereas Calcium (Ca) levels showed significant decreases after transportation ($P < 0.05$).

Keywords: Biochemistry, Hematology, Stallion, Stress, Transport.

Uzun Transporta Bağlı Aygırların Strese Tepkileri: Tam Kan Sayımı ve Serum Biyokimya Varyasyonları

Öz: Bu çalışmada, transportun atlarda bazı stres göstergelerine etkisini belirlemek amaçlanmıştır. 7 Safkan, 2 Arap, 1 Hollanda Yarım Kan ve 1 Fresyan olmak üzere 3-12 yaş arası 11 olgun at (aygır) kayıt edildi. Transport öncesi ve sonrasında, otomatik kan sayımı ile beyaz kan hücresi sayımı ve diğer ilgili parametreler belirlendi. İlgili biyolojik belirteçlerin serum aktiviteleri bir otoanalizör kullanılarak belirlendi. Na, K, Cl ve Ca düzeyleri de otoanalizör kullanılarak ölçüldü. Ortalama Platelet (PLT) ve Ortalama Hemoglobin Konsantrasyonu (MCHC) Total Lökosit (WBC) sayıları çalışma süresince sağlıklı atlar için bir farklılık göstermezken, Alyuvarlar (RBC), Hemoglobin (Hb) ve Hematokrit (Hct) düzeyleri ulaşımdan sonra anlamlı artışlar sergiledi ($P < 0.05$). Günlük ortalama glikoz konsantrasyonu transporttan sonra artış gösterdi ($P < 0.05$). Ortalama total protein, albümin, Aspartat aminotransferaz (AST) ve Kreatinin kinaz (CK) düzeyleri, transportun ardından 2. günde artmaktadır ($P < 0.05$). Ortalama kan üresi azotu, kreatinin, total bilirubin, Alanin aminotransferaz (ALT), Alkalen fosfataz (ALP), Laktat dehidrogenaz (LDH) ve Gama-gulutamil Transferaz (GGT), çalışma boyunca önemli değişiklikler göstermedi. Transporttan sonra ortalama Sodyum (Na), Potasyum (K) ve Klor (Cl) düzeyleri değişti ($P < 0.05$), nakil sonrası Kalsiyum (Ca) düzeyleri anlamlı düşüş gösterdi ($P < 0.05$).

Anahtar Kelimeler: Aygır, Biyokimya, Hematoloji, Stres, Transport.

¹Ali Evren HAYDARDEDEOĞLU

Aksaray University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Aksaray, TURKEY.
e-mail: ahaydardedeoglu@aksaray.edu.tr

*This article was presented as poster in the 32nd WVA congress, 2015-Istanbul, Turkey.

INTRODUCTION

Horses are transported for several reasons comprising sport (showing and racing) (1,2,3), breeding and slaughter for several times throughout their lives (4). It has been well recognized that in horses transport is a general stressor leading to salmonellosis (5), respiratory disease (6,7,8), elevated heart rates (9,10), and changes in plasma ascorbic acid (11), serum cortisol concentration (9,10,11,12,13) and muscle enzyme activities (13,14,15). Elevated sodium and blood glucose concentrations have also been detected in slaughtering horses (12,13,14,15,16).

Up to date the transportation of horses by road received attention, but limited scientific research has been (4) focused on both hematological and serum biochemical changes. Therefore the aim of this study was to determine the effect of one transport journey on some stress indicators in horses.

MATERIALS and METHODS

Horses and Study Design

Eleven adult stallion aged 3-12 years including 7 Thoroughbred, 2 Arabian, 1 Dutch Warmblood, and 1 Friesian were enrolled. All horses have had prior experience of transport; indeed 2 weeks prior to the study was performed, all horses were loaded and unloaded from the van in an attempt to ensure that all horses loaded without hesitation. This study was conducted in accordance with the ethical guidelines of animal experiments.

A study design consisted of one 19 h transport period from Nevsehir to Antalya, with a total of 867 km travelled. On day 0, prior to study horses were housed individually in their natural boxes and physiological data were collected to obtain baseline values. On day 1 horses were loaded to a commercial van. Travel commenced for 19 hour period. Horses were unloaded on day 2 and housed individually in boxes for post-transport period. Water was always available to the horses in their boxes.

A commercial van was designed to carry out a total of 11 stallions and was pulled by a tractor.

Horses were randomly enrolled in groups parallel to the length of the van, as described previously (21). Five horses faced the direction of the journey, and six other faced the opposite direction. Bedding (straw) was placed on the floor for secure footing. Windows were allowed to open fully for fresh air. Travel was initiated at early morning and continued for 19 h.

Laboratory Analyses

White blood cell counts and were determined by an automated cell counter (Abacus Junior Vet 5, Hungary). Serum activities of Alanine aminotransferase (ALT), Aspartate aminotransferase (AST), Alkaline phosphatase (ALP), Creatinine kinase (CK), Lactate dehydrogenase (LDH), Gama-glutamyl transferase (GGT) and glucose, Blood Urea Nitrogen (BUN), creatinine, total protein, albumine, total bilirubine levels were determined by use of an autoanalyzer (Spotchem ez sp-4430, Arkray, Japan). Serum cortisol levels and electrolyte analysis [Na, K, Cl and Ca], were detected by a microplate immunoassay technique using autoanalyzer in a private commefical lab.

Statistical Analyses

The effects of transportation and measurements taken after transport were evaluated using means for day 1 and 2, respectively, using Paired Samples t-test. Significance was declared whenever $P < 0.05$.

RESULTS

Blood Measurements

The WBC counts did not exhibit a variation and remained within the reference range (5.5 to $14.3 \times 10^3/_L$) for healthy horses during the study. Mean PLT and MCHC did not show significant levels (Table 1). RBC, Hb and Hct levels exhibited variations with increases after transportation ($P < 0.05$). MCHC exhibited variations with slight decrease after transportation ($P < 0.05$) (Table 1).

Table 1. Mean haematological values (\pm SD) of measurements and P-values of comparisons between day 0 (d 0) and following a 19-h posttransport period (d 2).**Tablo 1.** 0. Hematolojik ölçüm değerlerinin ortalaması (\pm SD) ve 0.(d 0) gün ile 19 saatlik bir nakliye sonrası dönem (d 2) arasındaki karşılaştırmaların P-değerleri.

	N	O. hour	19. hour	SD	P	
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	11	7.67	7.73	0.815	0.809	
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	11	7.77	12.82	2.005	0.000	***
HB (g/dL)	11	11.91	16.93	1.415	0.000	***
HCT (%)	11	40.54	50.79	1.768	0.000	***
MCV (fL)	11	46.40	40.88	5.605	0.006	***
MCHC (g/dL)	11	33.39	33.50	1.877	0.845	
PLT ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	11	150.25	147.92	6.945	0.269	

Serum Metabolites and Enzymes

Mean daily glucose concentration showed an increase after transportation ($P < 0.05$). (Table 2). Mean total protein, albumine, AST and CK levels showed increases on day 2, after transportation ($P < 0.05$). Neither serum concentrations of blood urea nitrogen nor of creatinin exhibited variation or difference ($P > 0.05$) between days 1 and 2. Besides mean values of total bilirubine, ALT, ALP, LDH and

GGT did not show significant changes throughout the study (Table 2).

Mean Na, K and Cl levels showed variations with increases after transportation ($P < 0.05$), whereas Ca levels showed significant decreases after transportation ($P < 0.05$). Mean serum cortisol levels showed significant increases after transportation ($P < 0.05$) (Table 2).

Table 2. Mean serum biochemical and metabolite values (\pm SD) of measurements and P-values of comparisons between day 0 (d 0) and following a 19-h posttransport period (d 2). Daily means (SD) and P values.**Tablo 2.** Ortalama serum biyokimyasal ve metabolit değerleri (\pm SD) ve 0. gün (d 0) ile 19 saat sonrası nakliye sonrası dönem (d 2) arasındaki karşılaştırmaların P değerleri. Günlük ortalama (SD) ve P değerleri.

	N	O. hour	19. hour	SD	P	
Glucose (mg/dL)	11	89.83	111.83	5.846	0.000	***
Blood Urea Nitrogen (mg/dL)	11	14.33	14.50	1.800	0.754	
Creatinin (mg/dL)	11	1.11	1.14	0.143	0.438	
Total Protein (g/dL)	11	6.25	7.53	0.407	0.000	***
Albumine (g/dL)	11	3.20	3.82	0.332	0.000	***
Total Bilirubine (mg/dL)	11	1.34	1.33	0.144	0.845	
ALT (IU/L)	11	13.75	14	2.800	0.763	
AST (IU/L)	11	311.17	396.67	40.218	0.000	***
ALP (IU/L)	11	188.08	187	6.815	0.593	
CK (IU/L)	11	12.33	28.84	3.091	0.000	***
LDH (IU/L)	11	271.17	270.25	9.209	0.737	
GGT (IU/L)	11	13	13.33	1.614	0.489	
Na ⁺ (mmol/L)	11	138.17	149.50	1.442	0.000	***
K ⁺ (mmol/L)	11	3.07	4.49	0.362	0.000	***
Cl ⁻ (mmol/L)	11	102.75	119.17	4.420	0.000	***
Ca ⁺⁺ (mmol/L)	11	3.09	2.69	0.175	0.000	***
Cortisole ($\mu\text{g/dL}$)	11	1.65	2.90	0.215	0.000	***

DISCUSSION and CONCLUSION

One of the most important problem is that the response to road transport equine practice worldwide (24). As a consequence several immunological, physiological, and metabolic alterations might prone horses to elevated susceptibility to disorders (diarrhea, colics, pneumonia laminitis and trauma) (24,25). Transportation is composed of several psychological stimuli, resulting with stress disrupting metabolism and homeostasis of affected animals (26,27,28).

Transportation includes various stressors comprising loading, unloading and penning in a novel and unfamiliar environment and confinement along with motion, vibrations, changes in climatic conditions, inadequate ventilation and food and water deprivation. Animals react and addict respond to challenges in their environment by various interacting mechanisms including behavioural, haematological, physiological and neuro-hormonal parameters. Age, sex and physiological conditions may also have influence on the behaviour of animals during handling and transport (17,18,19).

In a prior study analyzing relationships between transportation of 24 cold-blooded female horses forwarded to both long and short distances and an inflammatory condition [acute phase proteins, oxidative stress and muscle injury. Plasma and serum were withdrawn prior to transportation (T0), immediately after transportation (T1) and finally during slaughter (T2). Fibrinogen was elevated in all studied groups especially in fillies after long distance transportation, (205 ± 7.07 mg/dl at T0; 625 ± 35.35 mg/dl at T1, and 790 ± 14.14 mg/dl at T2). Malondialdehyde levels rose at T1 and reached the maximal level during T2. CK activity was also increased at T1 in younger horses, According to the latter study an intensified acute phase response along with oxidative stress and muscle trauma indicated an inflammatory condition (24). In the present study although the present authors did not evaluate direct biomarkers of stress or oxidative status, cortisol was markedly increased in horses

following transportation indicating relative stress as was also determined (25,29).

Significantly higher levels of GOT, GPT, LDH and ALT in contrast to the basal values were reported for sedentary horses following transportation (20). In addition, haematological and serum biochemical changes occur in horses confined during air transport (13). In the present study significantly higher levels in glucose, total protein, albumin, AST and CK levels ($P < .05$) were detected after transportation.

In horses in general CPK and AST are clinically important with muscular diseases because of their high activity in skeletal muscle (21,22,23). Moderate increases in CPK may be associated with moderate exercise or a training program, indeed more severe exercise and competitions may induce increases over 1.000 IU/L. In this study, the CK elevated following transport, and the activity of AST rose in response to transport. The increase in those two serum enzymes indicates minimal muscular insult due to 19 h of transport.

During stressful conditions as exercise or transportation, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activates and may result with an elevated plasma cortisol. Plasma cortisol concentration exhibited variation, with increase during 19h of transport. After the stressor (i.e., transportation) ceased, cortisol dramatically declined. This may be explained with cortisol's relatively short half-life of 1 to 1.5 h (23). The peak in cortisol levels was greater than post-transit cortisol levels evaluated in slaughter horses traveling for up to 30 h (20) but similar to concentrations in moderately exercised horses (20).

In a previous study of 9 h of transportation increased concentrations of cortisol was reported (3). In racehorses, short-term (300 km) transportation or an exercise effected similar serum enzyme and metabolic changes (5). The increases in serum total protein, Na, K and Cl levels after transportation ($P < 0.05$) indicate that the present horses may have had hypertonic dehydration. Although the horses had had water available in their boxes, during a stressful condition such as transport

dehydration may occur. In addition Hct levels exhibited variations with increases after transportation ($P<0.05$) in this study.

WBC counts were deemed as a general indicator of health and the ability of the horses handling stress during transport. The WBC counts showed increases during 24 hours transport in horses (20), however the WBC counts did not exhibit a variation and remained within the reference range for horses during this study. Regarding other relevant hematological indices RBC, Hb and Hct levels exhibited variations with increases after transportation ($P<0.05$) and MCHC exhibited variations with slight decrease after transportation ($P<0.05$).

As a result of horses undergoing 19 h transportation showed patophysiological responses that involve changes in stress indices, hematological and serum biochemical parameters, and dehydration. Changes in PCV (Ht) values may suggest that the horses did not consume sufficient water. The rise in cortisol concentration following transport may have an influence on the immune system. In addition the alterations in glucose concentration may have effect on energy metabolism.

REFERENCES

1. Austin SM., Foreman JH., Hungerford LL. 1995., Case-control study of risk factors for development of pleuropneumonia in horses. *J Am Vet Med Assoc*, 207, 325-328.
2. Baucus KL., Ralston SL., Nockels CF., McKinnon AO., Squires EL., 1990. Effects of transport on early embryonic death in mares. *J Anim Sci*, 68, 345-351.
3. Baucus KL., Squires EL., Ralston SL., McKinnon AO., Nett TM., 1990. Effect of transportation on the estrus cycle and concentration of hormones in mares. *J Anim Sci* 68, 419-426.
4. Clark DA., Friend TH., Dellmeier G., 1993. The effect of orientation during trailer transport on heart rate, cortisol and balance in horses. *Appl Anim Behav Sci*, 38, 179-189.
5. Codazza D., Maffeo G., Redaelli G., 1974. Serum enzyme changes and hemato-chemical levels in Thoroughbreds after transport and exercise. *J South African Vet Assoc*, 45, 331-334.
6. Crisman MV., Hodgson DR., Bayly WM., Liggitt HD., 1992. Effects of transport on constituents of bronchoalveolar lavage fluid from horses. *Cornell Vet*, 82, 233-246.
7. Fazio E., Ferlazzo A., 2003. Evaluation of Stress During Transport. *Vet Res Commun*, 27, 519-524.
8. Ferlazzo A., Caola G., Omero A., Panzera M., 1984. Modificazioni sieroenzimatiche nel Cavallo sedentario dopo trasporto. *Arch Vet Ital* 35, 27-30.
9. Friend TH., 2000. Dehydration, stress, and water consumption of horses during long-distance commercial transport. *J Anim Sci*, 78, 2568-2580.
10. Friend TH., Martin MT., Householder DD., Bushong DM., 1988. Stress responses of horses during a long period of transport in commercial truck. *J Am Vet Med Assoc*, 212, 838-844.
11. Hodgson DR., 1990. Diseases of the Muscle. In: Smith, BP. (Ed.) *Large Animal Internal Medicine*, Mosby Co., St.Louis. 4th Edition page 1336.
12. Lassourd V., Gayraud V., Laroute M., Alvinerie M., Benard P., Courtot Toutain PL., 1996. Cortisol deposition and production rate in horses during rest and exercise. *J Am Phys*, 271, 25-33.
13. Leadon DP., Frank C., Backhouse W., 1989. A preliminary report on studies on equine transit stress. *J Equ Vet Sci*, 9, 200-202.
14. Leadon DP., Daykin J., Blackhouse W., Frank C., Atock MA., 1990. Environmental, hematological and biochemical changes in equine transit stress. *Proceedings of the Am Assoc Equine Pract*, 36, 465-490.
15. Munro C., Lasley B., 1988. Non-radiometric methods for immunoassay of steroids hormones. In: Albertson, B.D. and H.P. (Ed.) *Non-radiometric Assays: Technology and Application in Polypeptide and Steroid Hormone Detection*. New York. Page 289-329 Alan R Liss, New York.
16. Munro C., Stabenfeldt G., 1984. Development of

- cortisol enzyme immunoassay in plasma. *J Endocrinol*, 101, 41-49.
17. Oikawa M., Kamada M., Toshikawa Y., Yoshikawa T., 1994. Pathology of equine pneumonia associated with transport and isolation of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *J Comp Path*, 111, 205-212.
 18. Owen RR., Fullerton J., Barnum DA., 1983. Effects of transportation, surgery, and antibiotic therapy in ponies infected with *Salmonella*. *American J Vet Res*, 44, 46-50.
 19. Stull CL., Rodiek AV., 1995. Effects of post prandial interval and feed type on substrate availability during exercise. *Equine Vet J*, 27, 362-366.
 20. Stull CL., Rodiek AV., 2000. Physiological responses of horses to 24 hours of transportation using a commercial van during summer conditions. *J Anim Sci*, 78, 1458-1466.
 21. Stull CL., Rodiek AV., 2002. Effects of cross-tying horses during 24 h of road transport. *Equine Vet J*, 34, 550-555.
 22. Waran NK., Cuddeford D., 1995. Effects of loading and transport on the heart rate and behavior of horses. *App Anim Behav Sci*, 43, 71-81.
 23. Waran N., Leadon D., Friend T., 2007. The effects of transportation on the welfare of horses. In: Waran N. (Ed.). *The Welfare of Horses*. Kluwer Academic Publishers: Springer, 1, 125-150.
 24. Wessely SJ., Bełkot Z., Bobowiec R., Kosior KU., Wojcik M., 2015. Transport induced inflammatory responses in horses *J Polish Vet Sci*, 18, 407-413.
 25. Nemeč Svete A., Cebulj-Kadunc N., Frangež R., Kruljč P., 2012. Serum cortisol and haematological, biochemical and antioxidant enzyme variables in horse blood sampled in a slaughterhouse lairage, immediately before stunning and during exsanguination. *J Anim Sci*, 6, 1300-1306.
 26. Wernicki A., Urban-Chmiel R., Kankofer M., Mikucki P., Puchalski A., Tokarzewski S., 2006. Evaluation of plasma cortisol and TBARS levels in calves after short-term transportation. *Rev Med Vet*, 157, 30-34.
 27. Andronie I., Parvu M., Andronie V., Ciurea A., 2009. Effects of transportation stress on some physiological indicators in sport horses. *J Zootech Bio*, 42, 379-384.
 28. Onmaz AC., Van den Hoven R., Gunes V., Cinar M., Kucuk O., 2011. Oxidative stress in horses after a 12-hours transport period. *Rev Med Vet*, 162, 213-217.
 29. Tateo A., Padalino B., Boccaccio M., Maggiolino A., Centoducati P., 2012. Transport stress in horses: effects of two different distances. *J Vet Behav Clin App Res*, 7, 33-42.



Comparison of Intranasal and Intramuscular Administration of Zolazepam-Tiletamine Combination in Cats

Latif Emrah YANMAZ[✉], Elif DOĞAN¹, Zafer OKUMUŞ¹, Mümin Gökhan ŞENOCAK¹, Uğur ERSÖZ¹, Sıtkıcan OKUR¹

1. Ataturk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, Erzurum, TURKEY.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
20.12.2016	22.02.2017	30.10.2017

Abstract: The purpose of the current study was to compare intranasal (IN) and intramuscular (IM) administration of zolazepam-tiletamine (ZT) combination in cats. Eight adult healthy cats weighing 2.47 ± 0.6 kg were used. Each animal received 10 mg/kg ZT combination by IN and IM routes with a minimum one week intervals. The onset of sedation, the length of surgical anaesthesia and the recovery time were recorded. The parameters were recorded immediately before and at 5, 10, 15, 20, and 30 min after administration of ZT combination. No anaesthetic complication was observed in either administration route. Recovery was uneventful in all animals. There were no statistical differences between the IN and IM administration with respect to onset of sedation and the length of anaesthesia. Recovery time was significantly shorter when the ZT combination was administered IN route (30.63 ± 0.32 min) compared to IM injection (33.38 ± 0.32 min). The route of administration of the ZT combination had no effect on heart rate ($P = 0.388$), respiratory rate ($P = 0.628$), rectal temperature ($P = 0.066$), and peripheral haemoglobin oxygen saturation ($P = 0.442$). Intranasal administration of ZT combination can be an alternative technique for sedation in cats.

Keywords: Anaesthesia, Cat, Intramuscular, Intranasal, Tiletamine, Zolazepam.

Kedilerde İntranasal ve İntramusküler Zolazepam-Tiletamine Kombinasyonu Uygulamasının Karşılaştırılması

Öz: Bu çalışmanın amacı kedilerde zolazepam-tiletamine (ZT) kombinasyonunun intramusküler (IM) ve intranasal (IN) uygulamasını karşılaştırmaktır. Ağırlıkları 2.47 ± 0.6 kg olan 8 sağlıklı erişkin kedi kullanıldı. Her kediye 10 mg/kg ZT kombinasyonunu uygulamalar arasında en az birer hafta ara olacak şekilde IN ve IM yol ile verildi. Sedasyon başlangıcı, cerrahi anestezi süresi ve uyanma zamanı kaydedildi. Parametreler ZT kombinasyonundan hemen önce ve uygulama sonrasındaki 5, 10, 15, 20 ve 30. dakikalarda kaydedildi. Her iki uygulama yolunda, herhangi bir anestezi komplikasyonu görülmedi. Tüm hayvanlarda uyanma problemsiz gerçekleşti. Anestezi süresi ve sedasyon başlangıcı değerleri, IN ve IM uygulamaya bağlı istatistiksel farklılık göstermedi. ZT kombinasyonu IN yolla verildiğinde (30.63 ± 0.32 dakika) IM enjeksiyona (33.38 ± 0.32 min) göre istatistiksel olarak daha kısa sürede uyanma gerçekleşti. ZT kombinasyonunun uygulama yolunun, kalp frekansı ($P = 0.388$), solunum sayısı ($P = 0.628$), rektal sıcaklık ($P = 0.066$) ve periferik hemoglobin oksijen saturasyonu ($P = 0.442$) değerleri üzerine etkisi yoktu. ZT kombinasyonunun intranasal uygulanması kedilerde sedasyon için alternatif bir teknik olabilir.

Anahtar Kelimeler: Anestezi, İntranasal, İntramusküler, Kedi, Tiletamine, Zolazepam.

✉ Latif Emrah YANMAZ

Ataturk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, Erzurum, TURKEY.
e-mail: emrah.yanmaz@atauni.edu.tr

INTRODUCTION

Zoletil or Telazol, combination of equal volume of zolazepam hydrochloride and tiletamine hydrochloride, has been used in veterinary patients for immobilization and minor surgical procedures due to its rapid anaesthetic action (1). Adverse effects of combination include salivation, muscle rigidity, hypothermia, respiratory depression, tachycardia, and a prolonged recovery time (2, 3).

Intravenous drug administration is less preferred route of administration than intramuscular (IM) injection in cats due to necessity of placing an intravenous catheter (4). However, IM injection of zolazepam-tiletamine (ZT) combination results with pain response in animals due to its low pH (5). Intranasal administration of ZT combination has been reported in a lynx for wound treatment (6) and cats for its effect on intraocular pressure (7).

The goal of the current study was to compare the effects of IN and IM administration of ZT combination on time to onset of sedation, length of surgical anaesthesia and recovery time.

MATERIALS and METHODS

Animals: This study has been approved by Atatürk University Local Board of Ethics Committee for Animal Experiments, Erzurum, Turkey (decision no: 2016/119). Eight healthy mixed-breed owned cats aged 3 years (four males and four females, mean weight 2.47 ± 0.6 kg SD) were used in this study. Client consent was obtained for each cat before the intervention. Prior to the experiment, the animals were underwent complete physical examination, thoracic x-ray and blood tests. Food, but not water, was withdrawn 12 hours prior to the anaesthesia.

Study design: Each animal (n=8) randomly received 10 mg/kg ZT combination (Zoletil-50, Virbac, Carros Cedex, France) by IN and IM routes with a minimum one week washout periods. The sterile saline was added to the ZT combination to reach the final volume of 1 mL for both administrations. For IN administration, the prepared solution was

administered equally (0.5 mL each) into the medial wall of each nasal cavity by using a 16 G intravenous catheter that attached to the insulin syringe (Figure 1). The catheter was inserted into the each nostril no more than 0.5 cm for possible damage in the caudal nasal cavity. During the each IN administration, the animal was gently restrained by an assistant, and the animal's head was held upward for 5 seconds. For IM administration, the prepared solution was administered into the quadriceps femoris muscle. Following the administration in both groups, the cats were placed on an examination table, and no noxious stimulation was applied throughout the anaesthesia.



Figure 1. Intranasal administration of zolazepam-tiletamine combination.

Şekil 1. Zolazepam-tiletamine kombinasyonunun intranasal uygulaması.

Onset of sedation was defined as the time from administration of drug to the time of when the animal became lateral recumbent. The length of

anaesthesia was determined as the time from lateral recumbency to the time of first head movement. Recovery was defined as the time from first head movement to time standing on its own.

Measurements: The heart rate (HR), respiratory rate (RR) rectal temperature (RT) and peripheral haemoglobin oxygen saturation (SpO₂) were measured by a veterinary vital signs monitor (Cardell, 9404, Sharn Veterinary Inc, USA). The probe of SpO₂ was attached to the ear of cats. All measurements were recorded immediately before (T₀; baseline) and at 5, 10, 15, 20, and 30 min after administration of ZT combination.

Statistical Analysis

Data were analyzed by one-way ANOVA. As the data were normally distributed, differences among mean values were treated with paired sample t-test. The effect of the route, time and the route by time interaction was considered significant at

$P < 0.05$. Data were presented as mean \pm SD. SPSS 19.0 for Windows (IBM Company, SPSS Inc, USA, 2010) was used to evaluate the data.

RESULTS

IN administration of ZT combination resulted with a sneezing reaction in cats, whereas IM administration of ZT combination caused a vocalization. No anaesthetic complication was observed in both administration routes. Recovery was uneventful in all animals.

There were no statistical differences between two administration routes with respect to onset of sedation ($P=0.749$) and the length of anaesthesia ($P=0.621$). Recovery time was significantly shorter when the ZT combination was administered IN route (30.63 ± 0.32 min) compared to IM injection (33.38 ± 0.32 min) (Table 1).

Table 1. The effect of administration route of 10 mg/kg zolazepam-tiletamine combination on onset of sedation, length of surgical anaesthesia and recovery time.

Tablo 1. 10 mg/kg zolazepam-tiletamine kombinasyonu uygulama yolunun uyanma zamanı, sedasyon başlangıcı ve cerrahi anestezi süresi üzerine etkisi.

	Intranasal	Intramuscular	<i>P</i>
Onset of sedation (min)	5.63 \pm 0.54	5.88 \pm 0.54	0.749
Length of surgical anaesthesia (min)	11.13 \pm 0.70	11.63 \pm 0.70	0.621
Recovery time (min)	30.63 \pm 0.32	33.38 \pm 0.32	0.000

In both groups, HR increased following induction of anaesthesia and remained significantly elevated thereafter ($P < 0.0001$). The RT ($P=0.04$) and SpO₂ ($P=0.042$) decreased following the anaesthesia. However, the RR did not significantly change with

time (Table 2). The route of administration of the ZT combination had no effect on HR ($P=0.388$), RR ($P=0.628$), RT ($P=0.066$), and SpO₂ ($P=0.442$) (Table 2).

Table 2. Values for physiological data measured in cats administered 10 mg/kg zolazepam-tiletamine combination either by the intranasal or the intramuscular route. Time point 0 represents the baseline value. Data are presented as mean \pm SD.

Tablo 2. Kedilere intranasal veya intramusküler yolla verilen 10 mg/kg zolazepam-tiletamine kombinasyonunda ölçülen fizyolojik verilerin değerleri. 0 zamanı uygulama öncesi değeri göstermektedir. Veri ortalama \pm SD olarak sunulmaktadır.

PRM	RA	Time after treatment (min)						P- values		
		0	5	10	15	20	30	RA	T	RA*T
RR	IN	25 \pm 2	26 \pm 3	24 \pm 2	25 \pm 6	26 \pm 2	25 \pm 5	0.628	0.945	0.977
	IM	25 \pm 3	25 \pm 5	25 \pm 4	25 \pm 3	25 \pm 3	25 \pm 3	-	-	-
HR	IN	147 \pm 14 ^a	187 \pm 21 ^b	197 \pm 25 ^b	198 \pm 17 ^b	201 \pm 24 ^b	205 \pm 26 ^b	0.388	<0.0001	0.986
	IM	143 \pm 11 ^a	183 \pm 16 ^b	192 \pm 18 ^b	195 \pm 23 ^b	197 \pm 16 ^b	201 \pm 18 ^b	-	-	-
RT	IN	37.9 \pm 0.3 ^a	37.3 \pm 0.5 ^b	37.2 \pm 0.6 ^b	37.3 \pm 0.8 ^b	37.3 \pm 0.5 ^b	37.1 \pm 0.2 ^b	0.06	0.04	0.867
	IM	37.8 \pm 0.5 ^a	37.3 \pm 0.4 ^b	37.3 \pm 0.4 ^b	37.1 \pm 0.3 ^b	37.0 \pm 0.4 ^b	37.0 \pm 0.7 ^b	-	-	-
SpO ₂	IN	96 \pm 4 ^a	92 \pm 2 ^b	92 \pm 5 ^b	91 \pm 1 ^b	92 \pm 3 ^b	91 \pm 4 ^b	0.442	0.042	0.942
	IM	95 \pm 2 ^a	93 \pm 3 ^b	92 \pm 3 ^b	92 \pm 2 ^b	91 \pm 3 ^b	90 \pm 2 ^b	-	-	-

RR (breaths per minutes): respiratory rate; HR (beats per minute): heart rate; RT (°C): rectal temperature; SpO₂(%): saturation of peripheral oxygen. PRM: parameter; IN: intranasal; IM: intramuscular. RA: route of administration; T: time; RA*T: interaction of administration route by time. ^{ab} Values with different superscripts within rows differ (P<0.05)

DISCUSSION and CONCLUSION

Zolazepam is in a group of benzodiazepine family that induces muscle relaxation and it is only available in combination with tiletamine, which is a member of cyclohexamine drug with a greater anesthetic potency and longer duration of action (8-11). The cyclohexamines causes an increase in HR due to increased catecholamine stimulation (1). In the current study, HR increased following the administration of ZT combination in both groups, which is consistent with previous study (3). In the present study RR did not change after the drug administration in both routes. Similar result was obtained when benzodiazepine and cyclohexamine combination has been used in cats (12). It has been stated that RT has tendency to decrease after administration of ZT combination due to muscle relaxation (13). In this study, RT decreased following the administration of ZT combination in both routes, which is consistent with previous report that used IM 2.5 mg/kg Zoletil in cats for sedation (14). In our study, SpO₂ value was not significantly different between groups. However, SpO₂ reduced following the administration of ZT combination in both groups.

This finding suggests that the possible decrease in SpO₂ should be taken into account when ZT combination has been applied by either route.

In the current study, sneezing reaction was observed in cats following the IN administration of ZT combination which agreed with the previous study that used midazolam and ketamine combination with IN route in cats (12). In this study, the IM administration ZT combination caused a vocalization in cats possibly due to its acidic pH (5). Therefore, IN administration of ZT combination, which was easily applied and non-invasive, could be preferred for anaesthesia induction in cats.

We have previously reported that IN administration of ZT to the cats can be achieved with direct administration of drug into the each nostril of cat (7), however in this study, the nostril diameter of animals was not enough large to put the syringe into the inside of nostrils. We therefore decided to attach a catheter to the insulin syringe for safety administration of drugs. As a consequence, both methods of administrations may be used for IN drug delivery in cats while taking into consideration the nostril diameter to prevent the damage of nasal cavity.

The recommended dosage range for anaesthesia with ZT combination in cats is 5 to 15 mg/kg (2, 5, 15, 16). Because the dosage less than 5 mg/kg of ZT combination is not able to produce effective sedation in cats, additional drugs such as methadone (17) or butorphanol (18) should be considered. Moreover, it has been reported that ZT combination is not suitable for surgical procedures even it has been used at the 15 mg/kg dose in cats (16). In the current study, even though no noxious stimulation was applied to the cats for evaluating the surgical anaesthesia, administration of 10 mg/kg ZT combination either by IN or IM route produces effective sedation which lasts about 30 minutes. This finding was similar with a previous study that used ZT combination at a dosage of 5 mg/kg subcutaneously (2).

A previous study has reported that no significant difference has been observed between length of anaesthesia and time to recovery when the ZT was injected at the dose of 12.8mg/kg to cats by either IM or intravenous route (5). In the current study, the length of anaesthesia did not differ between two administration routes; however, recovery was more rapid in IN administration than in the IM administration group. This could be related to the well vascularized nature of nasal mucosa (19), which might have affected the rapid removal of anaesthetic from tissues or more likely the sneezing reaction might have resulted with losing some anaesthetic agent during the IN administration.

Because the IN drug delivery occurs through transmucosal absorption (20), future studies may also be needed to demonstrate the plasma drug concentrations, distribution and the plasma clearance of ZT combination when administered by the IN route. Additionally, a study that focused on the detailed examination of anaesthetic parameters may also be needed to demonstrate the effectiveness of this technique. In conclusion, IN administration of ZT combination produces effective sedation in cats at the same dosage suggested for IM administration.

REFERENCES

1. Lin HC., Benson GJ., Thurmon JC., Tranquilli WJ., Olson WA., Bevill RF., 1993. Influence of anesthetic regimens on the perioperative catecholamine response associated with onychectomy in cats. *Am J Vet Res*, 54, 1721-1724.
2. Forsyth S., 1995. Administration of low dose tiletamine zolazepam combination to cats. *New Zeal Vet J*, 43, 101-103.
3. Hellyer P., Muir WW., Hubbell JA., Sally J., 1988. Cardiorespiratory effects of the intravenous administration of tiletamine-zolazepam to cats. *Vet Surg*, 17, 105-110.
4. Bortolami E., Murrell JC., Slingsby LS., 2012. Methadone in combination with acepromazine as premedication prior to neutering in the cat. *Vet Anaesth Analg*, 40, 181-193.
5. Tracy CH., Short CE., Clark BC., 1988. Comparing the effects of intravenous and intramuscular administration of telazol. *Vet Med*, 83, 104-111.
6. Yanmaz LE., Dogan E., Ersoz U., Okumus Z., Dogan V., 2017. Anaesthesia in a Eurasian lynx with an intranasal zolazepam–tiletamine combination. *Vet Anaesth Analg*, 44, 193-194.
7. Yanmaz LE., Dogan E., Okur S., Okumus Z., Ersoz U., 2016. Comparison of the effects of intranasal and intramuscular administrations of zolazepam–tiletamine combination on intraocular pressure in cats. *Vet Ophthalmol*, 19, 115-118.
8. Clarke KW., Trim CM., Hall LW., 2014. General pharmacology of the injectable agents used in anaesthesia. In: *Veterinary Anaesthesia*, 11th edn. (eds Clarke KW. and Trim C.) Elsevier Saunders, Edinburgh, UK, 135–153.
9. Şındak N., 1998. Köpeklerde tiletamin-zolazepam ve tiletamin-zolazepam-xylazin anestezisi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Türkiye*.
10. Jang M., Park S., Son WG., Jo SM., Hwang H., Seo K., Lee I., 2015. Effect of tiletamine-zolazepam on the intraocular pressure of the dog. *Vet Ophthalmol*, 18, 481-484.

11. Svorc P., Bacova I., Svorc P., Novakova M., Gresova S., 2016. Zoletil anaesthesia in chronobiological studies. *Biol Rhythm Res*, 47, 103-110.
12. Marjani M., Akbarinejad V., Bagheri M., 2015. Comparison of intranasal and intramuscular ketamine-midazolam combination in cats. *Vet Anaesth Analg*, 42, 178-181.
13. Lin HC., Thurmon JC., Benson GJ., Tranquilli WJ., 1992. Review: Telazol—a review of its pharmacology and use in veterinary medicine. *J Vet Pharmacol Ther*, 16, 383-418.
14. Spada E., Proverbio D., Bagnagatti De Giorgi G., Perego R., Valena E., Della Pepa A., Baggiani L., 2015. Clinical and haematological responses of feline blood donors anaesthetized with a tiletamine and zolazepam combination. *J Feline Med Surg*, 17, 338-341.
15. Cistola AM., Golder FJ., Centonze LA., Mckay LW., Levy JK., 2004. Anesthetic and physiologic effects of tiletamine, zolazepam, ketamine, and xylazine combination (TKX) in feral cats undergoing surgical sterilization. *J Feline Med Surg*, 6, 297-303.
16. Verstegen J., Fargetton X., Ectors F., 1989. Medetomidine/ketamine anaesthesia in cats. *Acta Vet Scand*, 85, 117-123.
17. Mair A., Kloeppe H., Ticehurst K., 2014. A comparison of low dose tiletamine-zolazepam or acepromazine combined with methadone for pre-anaesthetic medication in cats. *Vet Anaesth Analg*, 41, 630-635.
18. Ko JC., Abbo LA., Weil AB., Johnson BM., Payton M., 2007. A comparison of anesthetic and cardiorespiratory effects of tiletamine-zolazepam-butorphanol and tiletamine-zolazepam-butorphanol-medetomidine in cats. *Vet Ther*, 8, 164-176.
19. Grassin-Delyle S., Buenestado A., Naline E., Faisy C., Blouquit-Laye S., Couderc LJ., Le Guen M., Fischler M., Devillier P., 2012. Intranasal drug delivery: an efficient and non-invasive route for systemic administration: focus on opioids. *Pharmacol Therapeut*, 134, 366-379.
20. Pires A., Fortuna A., Alves G., Falcao A., 2009. Intranasal drug delivery: how, why and what for?. *J Pharm Sci*, 12, 288-311.



The Effects of *Rosmarinus officinalis* (Rosemary) Aqueous Extract on Smooth Muscle Contractions in Isolated Rat Urinary Bladder

Emin ŞENGÜL¹, Fikret ÇELEBİ¹, Volkan GELEN², Ali ÇINAR¹

1. Ataturk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology, Erzurum, TURKEY.
2. Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology, Kars, TURKEY.

Geliş Tarihi/Received
17.11.2016

Kabul Tarihi/Accepted
08.03.2017

Yayın Tarihi/Published
30.10.2017

Abstract: *Rosmarinus officinalis* (Rosemary) is widely used in traditional medicine and it has diuretic and spasmolytic effects on the ileum, trachea, and stomach smooth-muscle. However, a study the related effects of Rosemary on the myogenic activities of urinary bladder smooth-muscles has not been founded. The present study investigated the effects of Rosemary extract on the smooth-muscle contractility of isolated rat urinary bladder. Muscle strips were prepared from urinary bladder of male Sprague Dawley rats. Prepared muscle strips were placed in an isolated organ bath containing Krebs solution. The muscle strips were pre-contracted by inducing with Ach (10^{-4} M) and KCl (60mM), and these values were considered to be reference values. The effects of the different doses (150, 300, 600 and 1200 μ g/mL) of Rosemary extract on ACh and KCl-induced contractions were determined. It was determined that no different from references values of the contractions induced by ACh and KCl in the presence of Rosemary doses in bath ($P>0.05$). In the present study, the various doses of Rosemary extract had no effect on myogenic activity in rat urinary bladder smooth-muscle. It may be conceive that the use of Rosemary for different purposes does not result in an undesirable effect on the physiological activities of bladder smooth-muscle.

Keywords: Aqueous extract, Rat, *Rosmarinus officinalis*, Smooth muscle, Urinary bladder.

İzole Edilmiş Rat Mesane Düz Kas Kontraksiyonları Üzerine *Rosmarinus officinalis* (Rosemary) Aköz Ekstraktının Etkileri

Öz: *Rosmarinus officinalis* (Rosemary) geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır ve o diüretik etkiye ve ileum, trakea, mide düz kasları üzerine gevşetici etkilere sahiptir. Fakat Rosemary'nin idrar kesesi düz kaslarının miyojenik aktiviteleri üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada izole edilmiş rat mesane düz kas kontraktilesi üzerine Rosemary ekstraktının etkileri araştırılmıştır. Kas şeritleri Sprague Dawley cinsi erkek ratların mesanesinden hazırlandı. Hazırlanan kas şeritleri Krebs solüsyonu içeren izole organ banyosuna yerleştirildi. Kas şeritler ACh (10^{-4} M) ve KCl (60 mM) ile uyarılarak kastırıldı ve bu değerler referans değer olarak kabul edildi. ACh ve KCl ile indüklenen kontraksiyonlar üzerine Rosemary ekstraktının farklı dozlarının (150, 300, 600 ve 1200 μ g/mL) etkileri belirlendi. Banyoda Rosemary'nin dozlarının varlığında ACh ve KCl ile indüklenen kontraksiyonların referans değerlerden farklılık arz etmediği belirlendi ($P>0.05$). Mevcut çalışmada, Rosemary ekstraktının çeşitli dozlarının rat idrar kesesi düz kaslarının miyojenik aktivitesi üzerine etkisinin olmadığı görüldü. Çeşitli amaçlar için Rosemary kullanımının idrar kesesi düz kaslarının fizyolojik aktivitesi üzerine istenmeyen etkilerinin olmadığı düşünülebilir.

Anahtar Kelimeler: Düz kas, İdrar kesesi, Rat, *Rosmarinus officinalis*, Sulu ekstrakt.

INTRODUCTION

Interest in alternative medicine has increased in recent years, and the use of various plants in this area has gained momentum. *Rosmarinus officinalis* (Rosemary) is grown in many the regions of the world (1), and is commonly used in alternative medicine. Important compounds, such as rosmarinic acid, carnosic acid, carnosol, luteolin, kaempferol, and genkwanin, are isolated from Rosemary leaves (2,3), and Rosemary extract has numerous pharmacological activities, such as hepatoprotective (4), antithrombotic (5,6), anti-ulcerogenic (1), antidiabetic, antioxidant (7), antinociceptive (8), and anti-inflammatory effects (9). In addition, Rosemary has potential benefits in the prevention and treatment of several illnesses, such as atherosclerosis, ischemic heart disease, cataracts, and cancer (10), and is also used as an ethopharmacology agent in treating depression (11). Rosemary hydro-alcoholic extract cures ulcerative stomach lesions created with reserpine, ethanol, and indomethacin. However, it has been reported that Rosemary has no antisecretory effect on gastric acid (1). Rosemary volatile oil inhibits contractions in the tracheal smooth-muscles of rabbits and guinea pigs (12), and Rosemary ethanol extract has a spasmolytic effect on guinea-pig ileum (13). Haloui et al. (14) also showed that Rosemary has a diuretic effect. The effects of Rosemary on the various smooth-muscles have been determined in numerous previous studies (12,13,15), but we have found no articles related to its effects on the myogenic activities of bladder smooth-muscles. Plants used with treatment aims may have undesirable side effects on physiological systems. Therefore, the specific effects that they exert on a variety of tissues should be well established. In the present study, we determined the effects of Rosemary on myogenic activities in rat urinary bladder smooth-muscles.

MATERIALS and METHODS

The study was approved by the Local Ethics Committee on Animal Experiments of Atatürk University (Decision no: 2012/70)

Animals

A total of 24 samples from adult male Sprague Dawley rats, weighing 200–250 g, were used. All animals were purchased from the Veterinary Control and Research Institute Management, Erzurum, Turkey. The care of the animals was ensured by the provision of adequate moisture and light, room temperature, and water and food ad libitum until the day of the experiment. The experiments were conducted in accordance with the national guidelines for the use and care of laboratory animals and were approved by the local animal care committee of Atatürk University, Erzurum, Turkey.

Plant Material

Aerial parts of Rosemary were collected in Erzurum in July 2012. The collected leaves were dried in the shade and the dried materials were appropriately preserved in storage boxes in the dark.

Preparation of the Plant Extract

The Rosemary leaves was powdered by grinding with a blender. A total of 25 grams were then taken, to which 500 mL of pure water was added. The mixture was blended in a magnetic stirrer at boiling point for 15 minutes, then cooled at room temperature and filtered with Whatman No. 1 paper. The filtrate was frozen and lyophilized in lyophilizator at 5 µm-Hg pressure at -50 °C. The extract was placed in a glass bottle and then stored at -20 °C up to used (16).

Tissue Preparation

The rats were euthanized under ketamine hydrochloride (Ketalar: 75mg/kg) and xylazine (Rompun: 15 mg/kg) anesthesia by the humane cervical dislocation method. The abdominal cavity was cut open, and the whole bladder was immediately removed and placed in a Petri dish containing Krebs solution (composition: NaCl, 119; KCl, 4.75; CaCl₂, 2.5; MgSO₄, 1.5; KH₂PO₄, 1.2;

NaHCO₃, 25; glucose, 11 mM; and pH 7.4). The fatty tissues and serosal forms in the external parts of the bladder were then cleaned; the bladder was made planar by making a longitudinal incision in a vertical direction from the bladder neck toward its apex and opening the bladder. The bladder mucosa was cleared from mucosal forms by sharp dissection, and 2x10 mm longitudinal sections were taken from the bladder neck toward the apex, in a vertical direction (17,18). Two muscle strips were prepared from each bladder and then placed in a 20 mL organ bath (Emka Technologies, France) containing Krebs solution and gassed with 95% O₂/5% CO₂ at a stable temperature of 37°C (19). The high end of the muscle strips was bonded to an isometric transducer (ELJ-S045C-EMKA-R04003 ve R04004) and the lower end was bonded to the bath floor by a metal hook. After the muscle strips were stretched for 1 g, they were left to equilibrate for 60 minutes and were washed with fresh Krebs solution every 15 minutes. The contractile activities of the muscles strips were constantly recorded.

The LogEC₅₀ Values of the Acetylcholine (ACh) and Potassium Chloride (KCl)

Dose response curves were created using ACh (10⁻¹⁰-10⁻³ M-Figure 1) and KCl (20, 40, 60, and 80 mM-Figure 2). These doses were used for twelve different tissues by repeating them three times. Consequently, the LogEC₅₀ doses were determined as -4.85 for ACh and -2.74 for KCl using the Graphpad Prism computer program. Submaximal doses were identified as 10⁻⁴ for ACh and 60 mM for KCl.

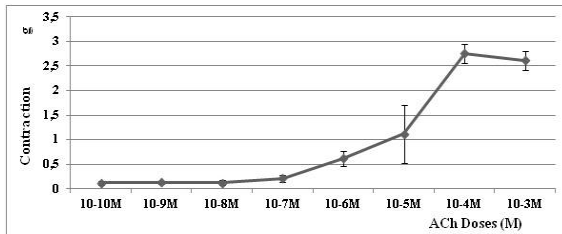


Figure 1. The dose-response curve of ACh.
Şekil 1. ACh'nin doz cevap eğrisi.

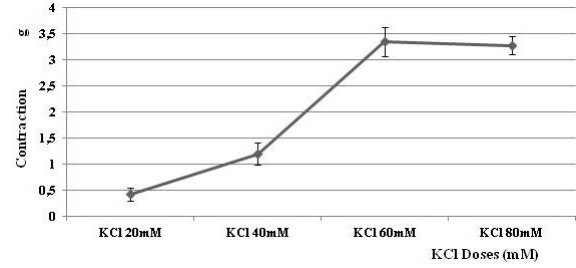


Figure 2. The dose-response curve of KCl.
Şekil 2. KCl'nin doz cevap eğrisi.

Muscle Strips Pre-contracted with ACh

Amplitudes of contractions, stimulated by ACh at a final concentration of 10⁻⁴ M, were recorded, after which a final concentration of 150 µg/mL Rosemary extract was given to the bath. After 10 minutes of exposure, the amplitudes of the muscular contractions, generated by the application of 10⁻⁴ M ACh, were recorded. This process was used for twelve different tissues by repeating it three times. The entire protocol was also carried out for the 300, 600, and 1200 µg/mL doses of Rosemary extract.

Muscle Strips Pre-contracted with KCl

Amplitudes of contractions, stimulated by KCl at a final concentration 60 mM, were recorded, after which a final concentration of 150 µg/mL Rosemary extract was given to the bath. After 10 minutes of exposure, the amplitudes of the muscular contractions, generated by the application of 60 mM KCl, were recorded. This process was used for twelve different tissues by repeating it three times. The entire protocol was also carried out for the 300, 600, and 1200 µg/mL doses of the Rosemary extract.

Statistical Analysis

The data were analyzed by using the SPSS version 20.0 statistical software. The data were evaluated by ANOVA, Tukey test. P<0.05 was considered as significant.

RESULTS

The Effects of Rosemary Extract on ACh-Induced Bladder Contractions

The contraction values obtained from bladder muscles at a 10^{-4} M dose of ACh were accepted as 100%. In the presence of 150, 300, 600 and 1200 $\mu\text{g/mL}$ doses of Rosemary in the bath was obtained contractions induced with submaximal dose (10^{-4} M) of ACh (Figure 3). These contraction values were

compared with the response induced with ACh accepted as 100% (Table 1).

At 150, 300, 600 and 1200 $\mu\text{g/mL}$ doses of Rosemary extract, the responses to 10^{-4} M ACh were $106.75\pm 11.12\%$, $104.64\pm 12.14\%$, $97.63\pm 11.42\%$, and $98.28\pm 10.97\%$, respectively (Figure 3). According to the indications, it was determined that the 150, 300, 600, and 1200 $\mu\text{g/mL}$ doses of Rosemary extract had no statistically significant effects on smooth-muscle contractions induced by ACh ($n: 12, P>0.05$).

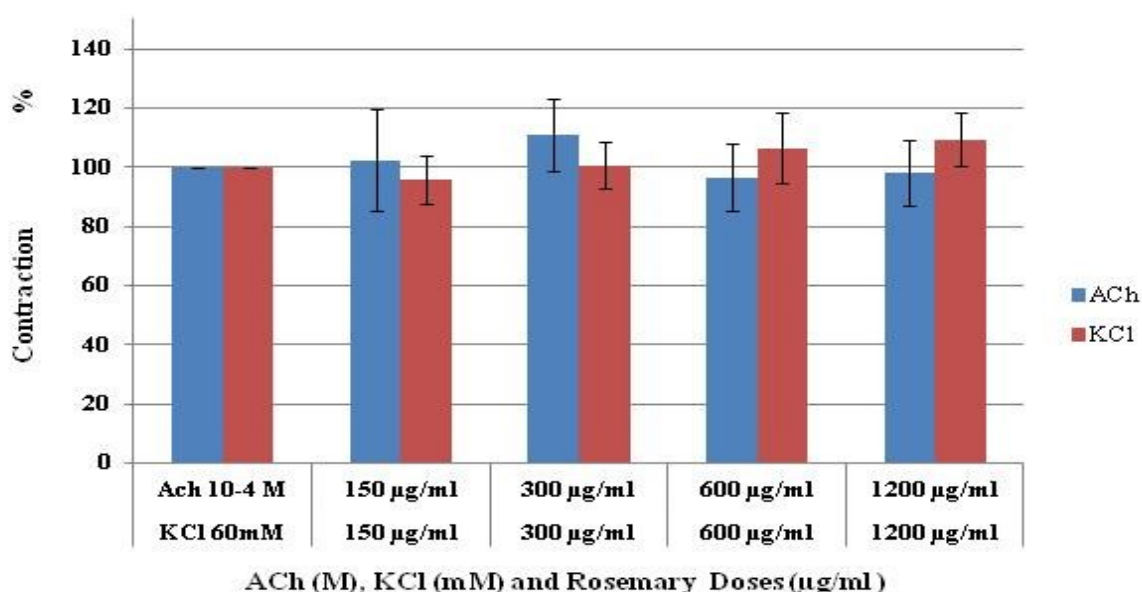


Figure 3. The effects of Rosemary extract (150, 300, 600 and 1200 $\mu\text{g/mL}$) on the smooth muscles contractions of rat urinary bladder induced by ACh and KCl. The among applied doses could not be found any statistically significant difference ($n: 12, P<0.05$).

Şekil 3. ACh ve KCl ile indüklenen rat mesane düz kas kontraksiyonları üzerine Rosemary ekstraktının (150, 300, 600 and 1200 $\mu\text{g/mL}$) etkileri. Uygulanan dozlar arasında herhangi önemli istatistiksel farklılık bulunmadı ($n: 12, P<0.05$).

Table 1. The effect of the Rosemary extract on rat urinary bladder smooth muscles contractions with ACh-induced ($n: 12$).

Tablo 1. ACh ile indüklenen rat mesane düz kas kontraksiyonları üzerine Rosemary ekstraktının etkileri ($n: 12$).

Rosemary Doses	Contractions (g)		Contractions (%)		P values ($n: 12$)
	10^{-4} M ACh	Extract+ 10^{-4} M ACh	10^{-4} M ACh	Extract+ 10^{-4} M ACh	
	$\bar{X}\pm\text{SEM}$	$\bar{X}\pm\text{SEM}$	$\bar{X}\pm\text{SEM}$	$\bar{X}\pm\text{SEM}$	
150 $\mu\text{g/mL}$	1.4 ± 0.31	1.43 ± 0.44	100 ± 0.00	102.14 ± 17.08	>0.05
300 $\mu\text{g/mL}$	1.49 ± 0.33	1.65 ± 0.30	100 ± 0.00	110.23 ± 12.14	>0.05
600 $\mu\text{g/mL}$	1.17 ± 0.2	1.13 ± 0.16	100 ± 0.00	96.58 ± 11.43	>0.05
1200 $\mu\text{g/mL}$	1.26 ± 0.17	1.23 ± 0.21	100 ± 0.00	98.17 ± 10.97	>0.05

The Effects of Rosemary Extract on KCl-Induced Bladder Contractions

The contraction values acquired from urinary bladder muscles at a 60 mM dose of KCl were accepted as 100%. In the presence of 150, 300, 600 and 1200 µg/mL doses of Rosemary in the bath was obtained contractions induced with submaximal dose (60 mM) of KCl (Figure 3). These values were compared with the response induced with KCl accepted as 100% (Table 2).

At 150, 300, 600, and 1200 µg/mL doses of Rosemary extract, the responses to 60mM KCl were 95.75±8.21%, 99.27±7.83%, 106.44±11.97%, and 109.44±8.90%, respectively (Figure 3). According to the indications, it was determined that the 150, 300, 600, and 1200 µg/mL doses of Rosemary extract had no statistically significant effects on smooth-muscle contractions induced by KCl (n: 12, P>0.05).

Table 2. The effect of the Rosemary extract on rat urinary bladder smooth muscles contractions with KCl-induced (n: 12).

Tablo 2. KCl ile indüklenen rat mesane düz kas kontraksiyonları üzerine Rosemary ekstraktının etkileri (n: 12).

Rosemary Doses	Contractions (g)		Contractions (%)		P values (n: 12)
	60 mM KCl	60 mM KCl+Extract	60 mM KCl	60 mM KCl+Extract	
	$\bar{X} \pm \text{SEM}$	$\bar{X} \pm \text{SEM}$	$\bar{X} \pm \text{SEM}$	$\bar{X} \pm \text{SEM}$	
150 µg/mL	1.32±0.52	1.26±0.42	100±0.00	95.75±8.21	>0.05
300 µg/mL	1.37±0.26	1.36±0.18	100±0.00	99.27±7.83	>0.05
600 µg/mL	1.58±0.59	1.68±0.66	100±0.00	106.44±11.97	>0.05
1200 µg/mL	1.74±0.65	1.9±0.72	100±0.00	109.44±8.90	>0.05

DISCUSSION and CONCLUSION

The present study examined the effects of Rosemary aqueous extract on the contractility of rat urinary bladder smooth-muscles. To induced the urinary bladder smooth muscle contractions were used as contractions inductive agent the ACh (10^{-4} M) and KCl (60 mM). KCl and ACh are agents that induce contraction, and are commonly used in the study of plant extracts, chemical compounds, or the effects of drugs on *in vitro* muscle contractility (20-22). When contractions were induced with KCl, voltage-sensitive L-type Ca^{2+} channels in the cell membrane were opened as a consequence of depolarization, which resulted from the increase of K^{+} in the muscle cells. The increase of intracellular ion concentration led to induction of contractions (23). When contractions were induced with ACh, intracellular Ca^{2+} release was triggered (24), and the activation of myosin fibers increased. This resulted in an increase in the density of depolarization and the action potential in the smooth-muscle cells (25). In addition,

with the help of G protein, ACh results in contractions via its connection with the postsynaptic M_3 receiver on smooth-muscle (26). Beer et al. (15) stated that high doses of Rosemary oil have a spasmolytic effect, while low doses of Rosemary oil increase contractions *in vitro* in stomach circular smooth-muscles. Zhu BT et al. (27) showed that Rosemary inhibits the uterotopic effects of these compounds on the uterus by increasing microsomal oxidation and glucuronidation of estrone and estradiol in the liver of female rats. To the best of our knowledge, no study of Rosemary's direct effects on uterus smooth-muscle contraction has been published. Ventura-Martínez R et al. (13) stated that Rosemary extract inhibited ileum contractions induced with ACh, KCl, and electrical field stimulation. They showed that contractions induced with ACh were inhibited by Rosemary oil in rabbit trachea smooth-muscle. In the same study, it was reported that contractions induced with histamine in trachea smooth-muscle were inhibited by this oil. It was found that Rosemary

oil dose-dependently and reversibly inhibited the contractions induced by high-dose potassium solution in rabbit smooth-muscles (12). In our study, the effects of 150, 300, 600, and 1200 µg/mL doses of Rosemary extract on smooth-muscle contractions induced by ACh and KCl in the rat urinary bladder were examined. When we evaluated our findings, we found that the Rosemary extract did not alter the contractions induced with ACh and KCl. In accordance with these results, it is may be considered that the compounds found in Rosemary extract have no effect on the mechanism that governs bladder smooth- muscle contractions.

In conclusion, compounds in Rosemary extract may not have an effect on mechanisms related to bladder smooth-muscle contractions. We believe that the use of Rosemary for different purposes will not result in an undesirable effect in pathological conditions, such as overactive bladder and bladder atony. In addition, we assert that the use of Rosemary by patients with such conditions will have neither a positive nor a negative effect.

REFERENCES

1. Dias PC., Foglio MA., Possenti A., de Carvalho J., 2000. Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L. *J Ethnopharmacol*, 69, 57-62.
2. Bai N., He K., Roller M., Lai CS., Shao X., Pan MH., Ho CT., 2010. Flavonoids and phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis*. *J Agric Food Chem*, 58, 5363-5367.
3. Ho CT., Wang M., Wei GJ., Huang TC., Huang MT., 2000. Chemistry and antioxidative factors in Rosemary and sage. *Biofactors*, 13, 161-166.
4. Sotelo-Felix JI., Martinez-Fong D., Muriel P., Santillan RL., Castillo D., Yahuaca P., 2002. Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. *J Ethnopharmacol*, 81, 145-154.
5. Hsieh CL., Peng CH., Chyau CC., Lin YC., Wang HE., Peng RY., 2007. Low-density lipoprotein, collagen, and thrombin models reveal that *Rosmarinus officinalis* L. exhibits potent antiglycative effects. *J Agric Food Chem*, 55, 2884-2891.
6. Yamamoto J., Yamada K., Naemura A., Yamashita T., Arai R., 2005. Testing various herbs for antithrombotic effect. *Nutrition*, 21, 580-587.
7. Bakirel T., Bakirel U., Keleş OU., Ulgen SG., Yardibi H., 2008. In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *J Ethnopharmacol*, 116, 64-73.
8. Gonzalez-Trujano ME., Pena EI., Martinez AL., Moreno J., Guevara-Fefer P., Deciga-Campos M., Lopez-Munoz FJ., 2007. Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J Ethnopharmacol*, 111, 476-482.
9. Altinier G., Sosa S., Aquino RP., Mencherini T., Della Loggia R., Tubaro A., 2007. Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. *J Agric Food Chem*, 55, 1718-1723.
10. Al-Sereiti MR., Abu-Amer KM., Sen P., 1999. Pharmacology of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *IJEB*, 37, 124-130.
11. Heinrich M., Kufer J., Leonti M., Pardo-de-Santayana M., 2006. Ethnobotany and ethnopharmacology-interdisciplinary links with the historical sciences. *J Ethnopharmacol*, 107, 157-160.
12. Aqel MB., 1991. Relaxant effect of the volatile oil of *Rosmarinus officinalis* on tracheal smooth muscle. *J Ethnopharmacol*, 33, 57-62.
13. Ventura-Martinez R., Rivero-Osorno O., Gomez C., Gonzalez-Trujano ME., 2011. Spasmolytic activity of *Rosmarinus officinalis* L. involves calcium channels in the guinea pig ileum. *J Ethnopharmacol*, 137, 1528-1532.
14. Haloui M., Louedec L., Michel JB., Lyoussi B., 2000. Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaurium erythraea*. *J Ethnopharmacol*, 71, 465-472.
15. Sagorchev P., Lukanov J., Beer AM., 2010.

- Investigations into the specific effects of Rosemary oil at the receptor level. *Phytomedicine*, 17, 693-697.
16. Nadaroglu H., Nazan D., Yasar D., 2009. Antioxidant and radical scavenging activities of capsules of caper (*Capparis spinosa*). *Asian J Chem*, 21, 5123-5134.
17. Celebi F., Dogan A., 2000. In vitro effects of some local anesthetic drugs (lidocaine, bupivacaine, prilocaine) on the rat urinary bladder muscles. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 6, 47-53.
18. Şengül E., 2014. *Achillea millefolium* (civanperçemi) ekstraktlarının ve bazı biyolojik aktif bileşiklerinin in vitro ortamda rat mesanesi düz kasları üzerine etkilerinin araştırılması. Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.
19. Karadeniz A., Pişkin İ., Altıntaş L., Eşsiz D., 2008. The Investigation of in vitro effects of oxybutynin and tolterodine on circular and longitudinal smooth muscles of rabbit bladder. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 14, 1-7.
20. Madeira SV., Matos FJ., Leal-Cardoso JH., Criddle DN., 2002. Relaxant effects of the essential oil of *Ocimum gratissimum* on isolated ileum of the guinea pig. *J Ethnopharmacol*, 81, 1-4.
21. Magalhaes PJ., Lahlou S., Leal-Cardoso JH., 2004. Antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on guinea-pig ileum: a myogenic activity. *Fundam Clin Pharmacol*, 18, 539-546.
22. Moazedi AA., Mirzaie DN., Seyyednejad SM., Zadkarami MR., Amirzargar A., 2007. Spasmolytic effect of *Petroselinum crispum* (Parsley) on rat's ileum at different calcium chloride concentrations. *Pak J Biol Sci*, 10, 4036-4042.
23. Karaki H., Ozaki H., Hori M., Mitsui-Saito M., Amano K., Harada K., Miyamoto S., Nakazawa H., Won KJ., Sato K., 1997. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev*, 49, 157-230.
24. Valeri A., Capasso R., Valoti M., Pessina F., 2012. Effects of St John's wort and its active constituents, hypericin and hyperforin, on isolated rat urinary bladder. *J Pharm Pharmacol*, 64, 1770-1776.
25. Reddy H., Watson N., Ford AP., Eglen RM., 1995. Characterization of the interaction between muscarinic M2 receptors and beta-adrenoceptor subtypes in guinea-pig isolated ileum. *Br J Pharmacol*, 114, 49-56.
26. Gerthoffer WT., 2005. Signal-transduction pathways that regulate visceral smooth muscle function. III. Coupling of muscarinic receptors to signaling kinases and effector proteins in gastrointestinal smooth muscles. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 288, 849-853.
27. Zhu BT., Loder DP., Cai MX., Ho CT., Huang MT., Conney AH., 1998. Dietary administration of an extract from Rosemary leaves enhances the liver microsomal metabolism of endogenous estrogens and decreases their uterotrophic action in CD-1 mice. *Carcinogenesis*, 19, 1821-1827.



Sıçanlarda Karbon Tetraklorürün (CCl₄) Neden Olduğu Koagülasyon Bozukluklarında Etil Pirüvatın Etkisi*

Ebru ÇETİN¹✉

1. Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
17.06.2016	10.01.2017	30.10.2017

Öz: Çalışmada, sıçanlarda karbon tetraklorürün (CCl₄) neden olduğu koagülasyon bozukluklarında etil pirüvatın (EP) etkisi araştırıldı. Kırk erkek Sprague Dawley ırkı sıçan dört eşit gruba ayrıldı. Kontrol grubuna 1 ml Ringer laktat solüsyonu 0., 1,5 ve 6. saatlerde periton içi verildi. Karbon tetraklorür grubuna 1.6 g/kg CCl₄ periton içi yolla tek doz verilmesini takiben 1.5 ve 6 saat sonra 1 ml Ringer laktat uygulandı. Etil pirüvat grubuna 40 mg/kg dozda etil pirüvat 0, 1,5 ve 6. saatlerde periton içi enjekte edildi. Etil pirüvat+CCl₄ grubuna ise tek doz 1.6 g/kg CCl₄ uygulamasından 30 dak. önce ve 1 ve 6 saat sonra 40 mg/kg dozda etil pirüvat periton içi uygulandı. Karbon tetraklorür, protrombin zamanı (PTZ) ve aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT) değerlerinde uzama (P<0.05), fibrinojen düzeyinde azalma (P<0.05) ve alanin aminotransferaz (ALT) aktivitesinde artma (P<0.05) oluşturdu. Öte yandan, CCl₄ grubuyla karşılaştırıldığında, CCl₄ uygulamasından 30 dak. önce ve 1 ve 6 saat sonra 40 mg/kg dozda verilen etil pirüvat fibrinojen düzeyini artırırken (P<0.05) PTZ ve aPTT sürelerinde ve ALT aktivitesinde azalmaya (P<0.05) neden oldu. Sonuç olarak, etil pirüvatın sıçanlarda CCl₄'ün neden olduğu pıhtılaşma bozuklukları üzerine koruyucu bir etki gösterebileceği tespit edildi. Etil pirüvatın bu etkisi, karaciğer hastalıklarıyla ilişkili pıhtılaşma bozukluklarının önlenmesinde yararlı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Etil pirüvat, Karbon tetraklorür, Pıhtılaşma bozuklukları.

Effect of Ethyl Pyruvate on Carbon Tetrachloride (CCl₄)-Induced Coagulation Disturbances in Rats

Abstract: The effect of ethyl pyruvate (EP) on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced haemostatic disturbances in rats was investigated in this study. Forty male Sprague-Dawley rats were divided into four equal groups. The control group was given intraperitoneally 1 ml of Ringer's lactate solution at 0 h, 1,5 h and 6 hours. The CCl₄ group was treated intraperitoneally with a single dose of 1.6 g/kg CCl₄ followed by the administration of 1 ml Ringer's lactate solution at 1,5 and 6 hours. The ethyl pyruvate group was injected intraperitoneally with ethyl pyruvate at a dose of 40 mg/kg at 0, 1,5 and 6 hours. The ethyl pyruvate +CCl₄ group were administered intraperitoneally with ethyl pyruvate at a dose of 40 mg/kg at 30 min before and at 1 and 6 h after a single dose of 1.6 g/kg CCl₄ injection. Treatment of CCl₄ prolonged prothrombin time (PT) and activated thromboplastin time (aPTT), decreased fibrinogen level and increased alanine aminotransferase (ALT) activity. On the other hand, the administration of EP intraperitoneally at 30 minutes before, and at 1.5 and 6 h after CCl₄ significantly (P<0.05) decreased PT, aPTT and ALT values and increased (P<0.05) fibrinogen level when compared with CCl₄-treated only group. The results of our study suggest that ethyl pyruvate treatment plays a protective role on CCl₄-induced coagulation disturbances in rats. This effect of ethyl pyruvate may be useful for preventing haemostatic disturbances associated with liver diseases.

Keywords: Carbon tetrachloride, Coagulation disorders, Ethyl pyruvate.

✉ Ebru ÇETİN

Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, TÜRKİYE.
e-posta: ecetin@erciyes.edu.tr

*Bu çalışma Uluslararası "Joint Meeting of the FEPS and the Baltic Physiological Societies, FEPS 2015, 26-29 August, Kaunas, Lithuania" Kongresinde poster olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Pirüvik asitin etil esteri olan etil pirüvat kararlı, dayanıklı, çözülebilir bir bileşiktir. Fizyolojik ortamda pirüvik asit, çoğunlukla anyon formu pirüvat olarak hücre içi ve hücreler arası sıvıda yerini alır (1). Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi tarafından güvenilir olarak sınıflandırılmıştır (2). Etil pirüvatın akut böbrek yetmezliği (3), miyokardiyal (4), intestinal (5) ve hepatik iskemi-resperfüzyon hasarı (6), hemorajik (7) ve septik şok (8), akut pankreatit (9) radyasyon hasarı (10) ve akut kronik karaciğer yetmezliği (11) gibi deneysel hayvan modellerinde organ hasarlarına karşı koruyucu rol oynadığı gösterilmiştir.

Karbon tetraklorür (CCl₄) bazı organlar üzerine çeşitli zararlı etkiler yapmakla birlikte en belirgin toksik etkisi karaciğer üzerinedir. Mitokondriyal ve ribozomal değişiklikler ile yağ infiltrasyonu gibi histopatolojik bozukluklardan başka hasarlı hepatositlerde lipit peroksidasyonu, lipit metabolizması bozuklukları ve protein sentezi bozukluklarına neden olur (12). Karaciğer hastalıklarında karaciğerin sentez fonksiyonu bozulduğu için hematolojik sistemde belirgin değişiklikler gözlenir. Bu değişikliklerin en önemlisi prognoz ile de yakından ilişkili olan hemostaz bozukluklarıdır. Faktör VIII dışında tüm pıhtılaşma faktörlerinin karaciğerde sentezlendiği göz önüne alınırsa, protein sentezindeki bozuklukların fibrinojen gibi diğer pıhtılaşma faktörlerinin sentezini de olumsuz yönde etkilemesi kaçınılmazdır. Karaciğer hastalıklarında birçok faktörün pıhtılaşma sistemi üzerine dolaylı ya da dolaysız olarak etkisi vardır. Yapılan çalışmalarda CCl₄ ile oluşturulan karaciğer hasarında parankim dejenerasyonu sonucu ekstrinsik ve intrinsik pıhtılaşma faktörlerinin yeterince sentezlenemediği, platelet sayı ve fonksiyonlarında azalma görüldüğü ve dolayısıyla pıhtılaşma mekanizmasının bozulduğu bildirilmiştir (13,14,15,16). Farelerde D-galaktozamin ile oluşturulan akut karaciğer hasarında bazı pıhtılaşma parametrelerinde bozukluklar görüldüğü ve yoğurt uygulamasının bu koagülasyon parametreleri üzerine iyileştirici rol oynadığı tespit edilmiştir (17).

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada ise CCl₄ ile oluşturulan koagülasyon bozukluklarına karşı grelin hormonunun koruyucu rol oynadığı bildirilmiştir (18).

Bu çalışma, sıçanlarda CCl₄ ile deneysel olarak oluşturulan akut karaciğer hasarı sonucu ortaya çıkan pıhtılaşma bozukluklarında etil pirüvat uygulamasının bazı pıhtılaşma parametreleri üzerine etkisi incelenerek, karaciğer hastalıklarında etil pirüvat uygulanmasının ekstrinsik ve intrinsik pıhtılaşma mekanizmaları üzerine olası koruyucu etkisini değerlendirmek amacıyla planlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Araştırmada Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırmalar Merkezinden temin edilen 280-320 g ağırlığında 40 adet erkek Sprague Dawley ırkı sıçan kullanıldı. Sıçanlar her grupta 10 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrılarak polietilen kafeslere yerleştirildi. Kontrol grubuna 1 ml Ringer laktat solüsyonu 0., 1,5. ve 6. saatlerde periton içi uygulandı. Karbon tetraklorür grubuna 1.6 g/kg CCl₄ periton içi yolla tek doz verildikten sonra (19) 1.5 ve 6 saat sonra 1 ml Ringer laktat, etil pirüvat grubuna 40 mg/kg dozda etil pirüvat 0, 1.5 ve 6. saatlerde periton içi, etil pirüvat+CCl₄ grubuna ise tek doz 1.6 g/kg CCl₄ uygulamasından 30 dak. önce ve 1 ve 6 saat sonra 40 mg/kg dozda etil pirüvat periton içi yolla verildi (11,20).

Son enjeksiyonun yapılmasından 24 saat sonra bütün hayvanlardan sodyum sitratlı tüplere kan alındı. Alınan kan örneklerinde aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT), protrombin zamanı (PTZ), fibrinojen düzeyi koagulometre (coatron) cihazında, trombosit sayısı ise otomatik kan sayım cihazında (Cymex SE900) belirlendi. Alanin aminotransferaz (ALT) aktivitesi ticari kit (Chema, Italy) kullanılarak spektrofotometrik yöntemle ölçüldü.

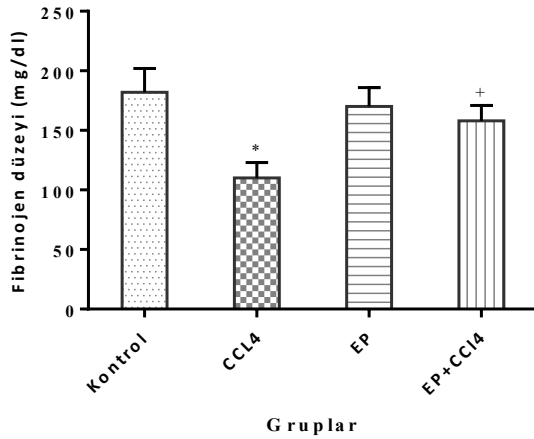
Deney süresince hayvanlar 20-25 °C'de ve 12 saat aydınlık/karanlık periyodunda tutuldu. Yem ve su *ad libitum* olarak verildi. Çalışma, Yerel Etik Kurul onayı çerçevesinde yapıldı (Karar No:2011/48).

İstatistiksel Analiz

İstatistikler, Windows uyumlu SPSS 20.0 istatistik paket programı ile yapıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu One-sample Kolmogorov-Smirnov testi kontrol edildikten sonra gruplar arasında farklılığı tespit etmek için One-Way ANOVA testi ve gruplar arası önemlilik düzeyini belirlemek için de Post-Hoc testlerden Tukey's testi kullanıldı. Sonuçlar aritmetik ortalama ve standart hata şeklinde verildi. Önemlilik düzeyi $P<0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

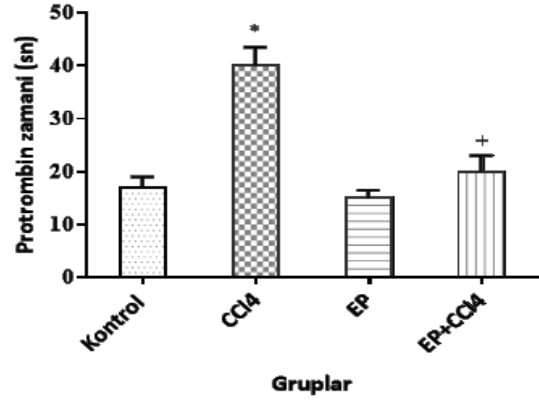
Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, CCl_4 grubunda PTZ ve aPTT değerlerinde önemli bir uzama ($P<0.05$) tespit edilirken fibrinojen düzeyinde ise önemli bir azalma ($P<0.05$) kaydedildi (Şekil 1, 2 ve 3). Aynı zamanda, karaciğer hasarının bir göstergesi olan ALT aktivitesinde, kontrol grubuna göre (29.24 ± 2.94) tek doz CCl_4 uygulanan grupta (59.16 ± 3.19) anlamlı bir artma belirlendi ($P<0.05$).



Şekil 1. Kontrol, CCl_4 , EP ve EP + CCl_4 gruplarında ortalama fibrinojen düzeyleri. *: Kontrol grubuna göre farklılık anlamlıdır ($P<0.05$). +: CCl_4 grubuna göre farklılık anlamlıdır ($P<0.05$). EP: Etil piüvat, CCl_4 : Karbon tetraklorür

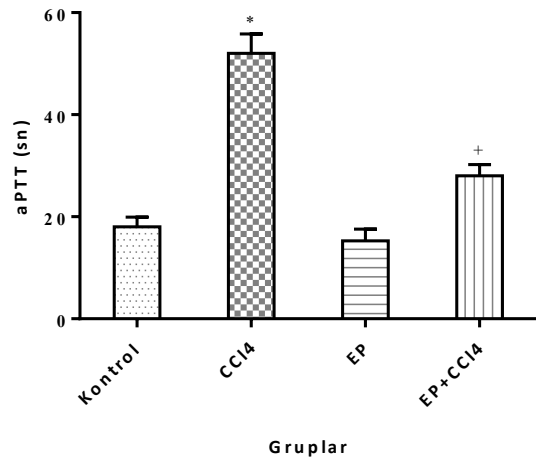
Figure 1. Mean fibrinogen levels in control, CCl_4 , EP and EP+ CCl_4 groups. *: Significantly different from the control group ($P<0.05$). +: Significantly different from the CCl_4 group ($P<0.05$). EP: Ethyl Pyruvate, CCl_4 : Carbon tetrachloride.

Trombosit sayısı açısından gruplar arasında önemli bir fark gözlenmedi ($P>0.05$).



Şekil 2. Kontrol, CCl_4 , EP ve EP + CCl_4 gruplarında ortalama protrombin zamanı. *: Kontrol grubuna göre farklılık anlamlıdır ($P<0.05$). +: CCl_4 grubuna göre farklılık anlamlıdır ($P<0.05$). EP: Etil piüvat, CCl_4 : Karbon tetraklorür

Figure 2. Mean prothrombin time in control, CCl_4 , EP and EP+ CCl_4 groups. *: Significantly different from the control group ($P<0.05$). +: Significantly different from the CCl_4 group ($P<0.05$). EP: Ethyl Pyruvate, CCl_4 : Carbon tetrachloride.



Şekil 3. Kontrol, CCl_4 , EP ve EP + CCl_4 gruplarında ortalama aktive parsiyel tromboplastin zamanı.

*: Kontrol grubuna göre farklılık anlamlıdır ($P<0.05$). +: CCl_4 grubuna göre farklılık anlamlıdır ($P<0.05$).

EP: Etil piüvat, CCl_4 : Karbon tetraklorür, aPTT: Aktive parsiyel tromboplastin zamanı.

Figure 3. Mean activated partial thromboplastin time in control, CCl_4 , EP and EP+ CCl_4 groups. *: Significantly different from the control group

($P<0.05$).⁺ : Significantly different from the CCl_4 group ($P<0.05$). EP: Ethyl Pyruvate, CCl_4 : Carbon tetrachloride, aPTT: activated partial thromboplastin time.

Diğer taraftan, CCl_4 grubuyla karşılaştırıldığında, CCl_4 uygulamasından 30 dakika önce ve 1 ile 6 saat sonra 40 mg/kg dozda verilen etil pirüvat'ın fibrinojen düzeyini artırırken PTZ ve aPTT sürelerinde azalmaya neden olduğu tespit edildi (Şekil 1, 2 ve 3). Bulgular ALT aktivitesi açısından incelendiğinde, ALT değerinin CCl_4 grubuna göre, CCl_4 ile beraber etil pirüvat uygulanan grupta (36.12 ± 2.10) önemli düzeyde azaldığı ($P<0.05$) kaydedildi.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Karaciğer, pıhtılaşma süreçlerinde önemli rol oynar. Akut ve kronik karaciğer hastalıklarında, pıhtılaşma ve inhibitör faktörlerin sentezindeki azalma, fibrinolizis, hızlanmış intravasküler koagülasyon ve aktive olmuş faktörlerin klirensinde azalma gibi bir çok faktöre bağlı olarak pıhtılaşma bozuklukları ortaya çıkar (21).

Çalışmamızda, CCl_4 verilen grupta; CCl_4 verilmesinden 24 saat sonra fibrinojen düzeyinde önemli derecede azalma gözlenmesi sıçan ve farelere tek doz CCl_4 verilerek oluşturulan deneysel karaciğer hastalıklarından 24 saat sonra fibrinojen düzeyinde gözlenen azalma bulguları (14,22) ile paralellik göstermektedir. Enzim aktivasyonu sonucu fibrine dönüşerek trombositler ile fibrin ağı oluşturan fibrinojenin plazmadaki düzeyinin azalması pıhtılaşma reaksiyonlarını olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle pıhtı oluşumunda görevli bir protein olan fibrinojenin CCl_4 ile oluşturulan karaciğer hasarında gözlenen kan seviyesindeki azalma, pıhtılaşma olayının baskılanmasına sebep olmaktadır. Diğer taraftan çalışmamızda, CCl_4 uygulamasından 30 dak. önce ve 1 ve 6 saat sonra 40 mg/kg dozda verilen etil pirüvat'ın fibrinojen düzeyini artırması etil pirüvatın pıhtılaşma sistemi üzerine koruyucu etki yaptığını göstermektedir. Karbon tetraklorür ile oluşturulan karaciğer hasarında parankimal hücrelerin sentez yeteneğinin bozulması

sonucu koagülasyon faktörlerinin azaldığı öne sürülmüştür (13). Bulgularımız, sıçanlarda fibrinojenin yenilenme hızının 23-41 saat olduğu bildirim (23) göz önüne alındığında uygulanan etil pirüvatın parankimal hücrelerin sentezleme yeteneğini artırarak fibrinojenin yenilenmesini hızlandırmak suretiyle CCl_4 'ün olumsuz etkisine karşı koagülasyon mekanizmasını koruduğunu düşündürmektedir.

Protrombin zamanı doku tromboplastini varlığında plazmanın pıhtılaşma süresini ölçer ve ekstrinsik ve ortak koagülasyon yolunun etkinliğini yansıtır ve dolayısıyla ekstrinsik ve ortak koagülasyon yollarında bulunan pıhtılaşma faktörlerinin (Faktör I, II, V, VII, X) düzeylerinden etkilenen bir parametredir. Parankimal karaciğer hastalığında protrombin, faktör V, VII, IX, X, XI, XII, XIII, antitrombin III, pre-kallikrein, HMWK, plazminojen konsantrasyonlarında azalma bildirilmiştir (24). Bu azalmalara bağlı olarak PTZ ve aPTT sürelerinde uzama gözlenmektedir. Çalışmamızda CCl_4 verilen grupta kontrol grubuna göre PTZ değerinde önemli bir uzama tespit edilmiştir. Bulgularımıza benzer şekilde, 0.2 ml tek doz CCl_4 uygulanan farelerde 24 saat sonra PTZ'nin uzadığı tespit edilmiştir (14). Sıçanlara günde 10 dk olmak üzere haftada 5 gün 22-40 kez 325 ppm dozunda CCl_4 uygulanmasının protrombin zamanını uzatması (15) bulgularımızla örtüşmektedir. Protrombin zamanındaki uzama ekstrinsik yolda pıhtılaşma reaksiyonlarının baskılandığını göstermektedir. Öte yandan çalışmada CCl_4 verilen gruba etil pirüvat uygulamasının protrombin süresini kontrol grubu değerlerine yaklaştırarak ekstrinsik yol üzerine koruyucu bir etki oluşturduğu saptandı. Lipopolisakkarit ile deneysel olarak oluşturulan endotoksemik rat modelinde, 40 ve 60 mg/kg olmak üzere farklı dozlarda etil pirüvat uygulamasının protrombin süresini kısaltarak ağır sepsis olaylarında koagülasyon bozukluklarını düzeltebileceği ifade edilmiştir (25). Domuzlarda deneysel olarak oluşturulan travmatik hemorajide etil pirüvatın protrombin süresini kısaltarak kan pıhtılaşmasını iyileştirdiği kaydedilmiştir (26). Çalışmada ayrıca,

sadece etil pirüvat uygulamasının PTZ değerinde önemli bir değişiklik oluşturmadığı saptandı.

Çalışmamızda, CCl₄ verilen grubun aPTT değerlerinde PTZ değerlerinde olduğu gibi önemi bir uzama tespit edildi. APTT değerinde uzama intrinsik veya ortak yolda koagülasyon faktörlerinin yetersizliğini göstermektedir (27). Karaciğer hastalıklarında genellikle bu değerde uzamaların görüldüğü bildirilmektedir (24). Sıçanlara tek doz CCl₄ verildikten 12 ve 24 saat sonra aPTT değerinde uzama kaydedilmiş ve CCl₄'ün parankimal hücrelerde hasara neden olarak intrinsik pıhtılaşma faktörlerinde yetmezliğe neden olduğu ileri sürülmüştür (14). Benzer şekilde CCl₄'ün farelerde ve sıçanlarda aPTT değerinde bir uzamaya neden olduğunun tespit edilmesi (15,28) bulgularımızı desteklemektedir. Çalışmada CCl₄ uygulamasından önce ve sonra verilen etil pirüvatın intrinsik pıhtılaşma faktörleri üzerine olumlu etki yaparak aPTT değerini normal değerlere yaklaştırdığı tespit edildi. Literatürde, etil pirüvatın aPTT değeri üzerine etkisine ilişkin herhangi bir veriye rastlanılmadı.

Koagülasyon sürecinde birçok pıhtılaşma faktörlerinin yanı sıra trombositler de önemli rol oynar. Çalışmada, trombosit sayıları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilemedi. Endotoksemik ratlarda yapılan bir çalışmada, etil pirüvatın azalan trombosit sayısını normale yaklaştırdığı rapor edilmiştir (29).

Sonuç olarak, CCl₄ ile akut karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda intrinsik ve ekstrinsik pıhtılaşma mekanizmalarının etkinliğini gösteren PTZ ve aPTT değerlerinde önemli bir uzama gözlemlenirken CCl₄ uygulamasından 30 dak. önce ve 1 ile 6 saat sonra 40 mg/kg dozda verilen etil pirüvatın bu değerleri kontrol grubu değerlerine yaklaştırdığının tespit edilmesi sıçanlarda etil pirüvat uygulamasının muhtemelen karaciğerin sentez aktivitesini artırmak suretiyle koagülasyon sistemi üzerine koruyucu bir etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Etil pirüvatın bu etkisi, karaciğer hastalıklarıyla ilişkili pıhtılaşma bozukluklarının önlenmesinde yararlı olabilir.

KAYNAKLAR

1. O'Donnell-Tormey J., Nathan CF., Lanks K., DeBoer CJ., de la Harpe J., 1987. Secretion of pyruvate: an antioxidant defense of mammalian cells. *J Exp Med*, 165, 500-514.
2. Uchiyama T., Delude RL., Fink MP., 2003. Dose-dependent effects of ethyl pyruvate in mice subjected to mesenteric ischemia and reperfusion. *Intensive Care Med*, 29, 2050-2058.
3. Salahudeen AK., Clark EC., Nath KA., 1991. Hydrogen peroxide-induced renal injury. A protective role for pyruvate in vitro and in vivo. *J Clin Investing*, 88, 1886-1893.
4. Bunger R., Mallet RT., Hartman DA., 1989. Pyruvate-enhanced phosphorylation potential and inotropism in normoxic and postischemic isolated working heart: near complete prevention of reperfusion contractile failure. *Eur J Biochem*, 180, 221-233.
5. Cicalese L., Lee K., Schraut W., Watkins S., Borle A., Stanko R., 1999. Pyruvate prevents ischemia-reperfusion mucosal injury of rat small intestine. *The Am J Surg*, 171, 97-100.
6. Sileri P., Schena S., Morini S., Rastellini C., Pham S., Benedetti E., Cicalese L., 2001. Pyruvate inhibits hepatic ischemi reperfusion injury in rats. *Transplant*, 72, 27-30.
7. Tawadrous ZS., Delude RL., Fink MP., 2002. Resuscitation from hemorrhagic shock with Ringer's ethyl pyruvate solution improves survival and ameliorates intestinal mucosal hyperpermeability in rats. *Shock*, 17, 473-477.
8. Ulloa L., Ochani M., Yang H., Tanovic M., Halperin D., Yang R., Czura CJ., Fink MP., Tracey KJ., 2002. Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *PNAS*, 99, 12351-12356.
9. Yang R., Uchiyama T., Alber SM., Han X., Watkins SK., Delude RL., Fink MP., 2004. Ethyl pyruvate ameliorates distant organ injury in a murine model of acute necrotizing pancreatitis. *Crit Care Med*, 32, 1453-1459.
10. Epperly M., Jin S., Nie S., Cao S., Zhang X.,

- Francicola D., Wang H., Fink MP., Greenberger JS., 2007. Ethyl pyruvate, a potentially effective mitigator of damage after total-body irradiation. *Radiat Res*, 168, 552-559.
11. Wang LV., Wang LK., Chen H., Fan C., Li X., He CM., Gong ZJ., 2012. Ethyl pyruvate protects against experimental acute-on-chronic liver failure in rats, *World J Gastroenterol*, 18, 5709-5718.
12. Hatch GE., Santrock J., Slade R., Hayes JM., 1988. Detection of CCL4-induced oxidation of hepatic tissue in vivo by oxygen-18 tracing. *Toxicol Appl Pharmacol*, 93, 81-88.
13. Okazaki M., Zhang LS., Suzuki M., Sakamoto K., 1988. The measurement of platelet aggregation and ATP-release in mice with liver damage induced by carbontetrachloride (CCl4) using a whole blood aggregometer. *Jpn J Pharmacol*, 48, 407-15.
14. Okazaki M., Furuya E., Shin Y., Sakamoto K., 1986. Studies on alterations in blood coagulative and fibrinolytic activities after single and multiple administrations of carbontetrachloride in mice. *Jpn J Pharmacol*, 41, 447-458.
15. Vazquez C., Bujan J., Vallejo D., 1990. Blood coagulation variations induced by carbontetrachloride inhalation in Wistar rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 103, 206-213.
16. Sakamoto K., Otsuka K., Kasahara T., Abe K., 1986. Effect of carbontetrachloride on blood coagulation and fibrinolytic activities in rats. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 88, 255-262.
17. Haro C., Lazarte S., Zelaya H., Alvarez S., Agüero G., 2009. Yogurt: Effect on leukocytes and blood coagulation in an acute liver injury model. *J Med Food*, 12, 796-802.
18. Arıcı OF., Çetin N., 2011. Protective role of ghrelin against carbontetrachloride (CCl4)- induced coagulation disturbances in rats. *Regul Pept*, 166, 139-142.
19. Çetin E., Kanbur M., Çetin N., Eraslan G., Atasever A., 2011. Hepatoprotective effect of ghrelin on carbontetrachloride-induced acuteliver injury in rats. *Regul Pept*, 171, 1-5.
20. Lee L., Kwon W., Jo Y., Suh G., Youn Y., 2008. Protective effects of ethyl pyruvate treatment on paraquat-intoxicated rats. *Hum Exp Toxicol*, 27, 49-54.
21. Amitrano L., Guardascione MA., Brancaccio V., Balzano A., 2002. Coagulation disorders in liver disease. *Semin Liver Dis*, 22, 83-96.
22. Ishii H., Kuboki M., Ohkura M., Hiraishi S., Tsubouchi J., Kazama M., 1985. Effect of intraperitoneal injection of topical thrombin on the coagulation and fibrinolysis of rabbits with experimental liver damages. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 85, 97-110.
23. Nieuwenhuizen W., Emeis JJ., Vermond A., Kurver P., van der Heide D., 1980. Studies on the catabolisms and distribution of fibrinogen in rats. *Biochem Biophys Res Comm*, 97, 49-55.
24. Kelly DA., Tuddenham EG., 1986. Haemostatic problems in liver disease. *Gut*, 27, 339-349.
25. Kung CW., Lee YM., Yen MH., 2011. In vivo anticoagulant effect of ethyl pyruvate in endotoxemic rats. *Thromb Res*, 127, 582-588.
26. Dong W., Cai B., Pena G., Pisarenko V., Vida G., Doucet D., Lee M., Sharpe S., Lu Q., Xu DZ., Ramos L., Deitch EA., Ulloa L., 2010. Ethyl pyruvate prevents inflammatory responses and organ damage during resuscitation in porcine hemorrhage. *Shock*, 34, 205-213.
27. Duncan JR., Prasse KW., Mahaffey EA., 1986. Erythrocytes. 2nd ed., 7-9, *Veterinary laboratory medicine clinical pathology*, Iowa State University Press, Ames, Iowa.
28. Yoshiyuki T., Yoshikazu O., Takemi Y., 2006. Effects of two formulations of combination drug (liver extract and flavin adenine dinucleotide sodium), acelart and adelavin, on carbontetrachloride-induced experimental hepatic dysfunction and weight in riboflavin deficient rats. *Jpn Pharmacol Ther*, 34, 669-674.
29. Wang W., Zhao F., Fang Y., Li X., Shen L., Coa T., Zhu H., 2013. Glycyrrhizin protects against porcine endotoxemia through modulation of systemic inflammatory response. *Crit Care*, 17, R44.



L-Name Hipertansif Ratlarda Ace İnhibitörü ile Birlikte L-Karnitin ve Co-enzim Q₁₀ Verilmesinin Total Oksidan ve Antioksidan Düzeyleri Üzerine Etkileri*

Nadide Nabil KAMILOĞLU¹, Yeliz KOLAY²

1. Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Kars, TÜRKİYE.
2. Hekim Sinan Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi, Kütahta, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
25.11.2016	21.02.2017	30.10.2017

Öz: Bu çalışma ile L-NAME hipertansif ratlarda ACE inhibitörü ile birlikte L-karnitin ve Co-enzim Q₁₀ verilmesinin total oksidan-antioksidan sistem üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla, ortalama 200-250 gr, 8 haftalık, 60 erişkin Sprague-Dawley rat kullanıldı. Ratlar her grupta 20 rat bulunacak şekilde, 1 kontrol ve 2 deney grubu olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Çalışmaya başlamadan önce tüm gruplara 10 gün süreyle intraperitoneal (i.p) olarak 75 mg/kg L-NAME verilerek hipertansiyon oluşturuldu. Hipertansiyon oluşturulduktan sonra, Kontrol grubuna 10 mg/kg ACE inhibitörü, L-karnitin grubuna 10 mg/kg ACE inhibitörü + 100 mg/kg L-karnitin, Co-enzim Q₁₀ grubuna 10 mg/kg ACE inhibitörü + 100 mg/kg Co-enzim Q₁₀ ip olarak verildi. Plazma total oksidan düzeylerinin hem L-karnitin hem de Co-enzim Q₁₀ gruplarında, kontrol grubuna göre 28. günde istatistiksel olarak önemli düzeyde düşük olduğu belirlendi (P<0.05). Plazma total antioksidan düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak bir farklılık gözlenmedi. Kalp dokusu total oksidan düzeylerinin 14. günde L-karnitin grubunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu (P<0.001), Co-enzim Q₁₀ grubunda ise istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı belirlendi. 28. günde deneme gruplarının kalp dokusu total oksidan düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak düşük olduğu, bu düşüşün L-karnitin uygulanan grupta daha belirgin olduğu görüldü (P<0.001). Kalp dokusu total antioksidan düzeylerinde istatistiksel olarak bir farklılık tespit edilmedi. Sonuç olarak, L-karnitin ve Co-enzim Q₁₀'nun hipertansiyonda kalbi ve damar sistemini serbest radikal hasarından koruyarak, oluşacak ikincil problemlerin şiddetini azaltabilecekleri kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: ACE inhibitörü, Antioksidan, Co-enzim Q₁₀, Hipertansiyon, L-karnitin, Oksidan.

Effects of L-Carnitine and Co-enzyme Q₁₀ Together with ACE Inhibitors on Total Oxidant and Antioxidant Levels in L-Name Hypertensive Rats

Abstract: In this study we aimed to find out the affects of giving ACE inhibitor with L-carnitine and Co-enzyme Q₁₀ on the oxidant-antioxidant system. For this purpose, 8 week-old and approximately 200-250 gr, 60 adult Sprague-Dawley rats were used. The animal were divided into three groups, served as 1 control and 2 experimental groups and each had 20 rats. Before starting the study, 75 mg/kg L-NAME given intraperitoneally to all groups for ten days to create hypertension. 10 mg/kg ACE inhibitor to the control group, 100 mg/kg L-carnitine+10 mg/kg ACE inhibitor to the L-carnitine group, 100 mg/kg Co-enzyme Q₁₀+10 mg/kg ACE inhibitor to the Co-enzyme Q₁₀ group was given. There were statistically significant decrease in the plasma levels of total oxidant in Co-enzyme Q₁₀ and L-carnitine groups when compared to the control on 28th day (P<0.05). There were no statistically significant difference between the groups in terms of plasma total antioxidant levels. Total oxidant levels of heart tissue in the L-carnitine group was statistically lower than the control group (P<0.001) on the day 14th. There were no statistically significant difference on the total oxidant levels of heart tissue in Co-enzyme Q₁₀ group. The total oxidant levels of heart tissue of the experimental groups were statistically lower than the control group on 28th day, and this decrease was more prominent in the L-carnitine group (P<0.001). There were no statistically significant difference in total antioxidant levels of heart tissue. It was concluded that due to the antioxidant properties of L-carnitine and Co-enzyme Q₁₀ in hypertension, these substances protects the heart and vascular system against free-radical damage, and also reducing the severity of secondary problems.

Keywords: ACE inhibitor, Antioxidant, Co-enzyme Q₁₀, Hypertension, L-carnitine, Oxidant.

¹ Nadide Nabil KAMILOĞLU

Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Kars, TÜRKİYE.

e-posta: nkamiloglu@hotmail.com

*Yeliz Kolay'ın tezinden yapılan bu araştırma Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından (VF-41-2010) desteklenmiştir.

GİRİŞ

Hipertansiyon kalp, beyin ve böbrekler gibi hedef organlar üzerindeki etkileri nedeniyle, kalp ve damar rahatsızlıklarına bağlı mortalite ve morbidite için ciddi bir risk faktörüdür (1). Multifaktöriyel temellere dayanan patojenezinde, Na hipotezi ve endotelium disfonksiyonu en kabul edilen yaklaşımlardır. Periferik damar direnci artışıyla seyreden hipertansiyon, nitrik oksit (NO) ve prostasiklin gibi endotelium kaynaklı vazodilatör sistemlerin zaafiyetiyle ilişkilendirilmektedir (2). Oldukça güçlü bir vazodilatör olan NO'in arteriyel kan basıncı ile lokal kan akımının düzenlenmesinde önemli rolü olduğu ve NO sentez ve/veya salınımının azalmasının hipertansiyon patojenezinden sorumlu olabileceği bildirilmektedir (3). Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleri tarafından L-arjinin'den sentezlenmektedir. Diğer taraftan, NG-nitro-L-arjinin (L-NNA), NG-nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME) gibi L-arjinin analoglarının, NOS enzimlerinin kronik inhibisyonuna neden olarak arteriyel kan basıncının artmasına ve hipertansiyon gelişmesine neden olduğu da bilinmektedir (4). Nitrik oksit gibi renin anjiotensin sisteminin (RAS) de vasküler biyolojide ve patobiyolojide doğrudan ve dolaylı etkileriyle hipertansiyon patojenezinde büyük öneminin olduğu bildirilmiştir (5). Bu sistem glomerulus afferent ve efferent arterioller arasında geçen distal tübül hücrelerinin afferent arteriole temas ettiği yerde makula densa hücreleri ile başlar. Buradaki afferent arteriol hücreleri de jukstaglomerular hücreleri oluşturur. Makula densada sodyum ve klor iyonlarının miktarındaki azalma jukstaglomerular hücrelerden renin salınımının artmasına neden olur. Renin angiotensinojeni, angiotensin I (Ang I)'e, Ang I' de akciğerde Ang dönüştürücü enzim (ACE) ile Ang I' i, Ang II' ye dönüştürülür. Ang II efferent arteriolü daraltır ve glomeruler hidrostatik basınç yükseltilek glomeruler filtrasyon hızı normal sınırlarda tutulur (6). Hipertansiyon hipotezinde bu sistemin ana üyeleri Ang-II ve ACE olarak kabul edilir (7, 8). ACE inhibitörleri, günümüzde etkili ve güvenilir antihipertansif ve vasküloprotektif olarak klinik kullanımda yerlerini almıştır. Bu ajanların, beta

blokörler ve kalsiyum kanal blokörleri gibi diğer antihipertansif ilaçlardan daha üstün oldukları gösterilmiştir (9).

Son yıllarda yaşam koşullarının ve beslenme şekillerinin değişmesine bağlı olarak şekillenen stres faktörlerinin, hipertansiyon oluşumu için alt yapı oluşturduğu bildirilmektedir (10). Hücresel dengenin sürekli değişmesine neden olan stres faktörleri nedeniyle artan serbest radikaller, hücre membranlarında lipit peroksidasyon sonucu permabilite artışına ve yük dengesinde bozulmaya neden olarak hücreleri risk altına sokmaktadır (11). Serbest radikallerin neden olduğu zararlı etkilere karşı antioksidanlar, hücresel savunma komponentlerinin entegrasyonunu sağlayarak hücrenin korunmasında önemli etkilere sahiptirler. Bu nedenle, doku ve hücrelerde serbest radikaller ve antioksidan maddeler arasındaki dengenin sağlanabilmesi amacıyla selenyum, α-tokoferol, L-karnitin, Co-enzim Q₁₀ ve propolis gibi antioksidan maddeler kullanılmaktadır (12). L-karnitin, karaciğer ve böbrekte lizin ve metiyonin gibi aminoasitlerden sentezlenen ve uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriyal matrikse taşınmasını sağlayan bir proteindir (13,14). L-karnitin'in, organizmaya güçlü toksik etkileri olan endojen veya eksojen organik asitlerin konjugasyonunda da görev yaptığı bilinmektedir. (15). Dolaşımdaki lenfositlerde çok yüksek oranlarda bulunan L-karnitin'nin, bu hücrelerin apoptoza uğramasını geciktirdiği ve mitojenik aktivitenin artmasını sağladığı bildirilmiştir (13). L-karnitin'in normal metabolizma sırasında üretilen serbest oksijen radikalleri tarafından yağ asitlerinin peroksidasyon reaksiyonlarını tersine çevirdiği gösterilmiştir (16). L-karnitin'in yağ asitlerini taşıyan bir substans olması yanında, serbest radikal tutucu aktivitesiyle dokuları oksidatif hasardan koruyucu bir antioksidan olduğu da gösterilmiştir (17). Ayrıca, Calo ve ark. (18) L-karnitin'nin oksidatif stres koşullarında antioksidan etkinliğini NO salınımını arttıran gen ekspresyonunu uyarması nedeni ile gösterdiğini ve bu etkisinin kardiyovasküler sistemi koruyucu niteliğini kuvvetlendirdiğini

bildirmektedir. L-karnitin'in; NO salınımına, hücre sel solunum mekanizmalarına ve oksidatif hasara karşı savunmaya katılan enzimlerin aktivitesini düzenleyerek oksidatif stresi önlediği de gösterilmiştir (19).

Co-enzim Q₁₀ insanlarda ve tüm hayvanlarda sentezlenebilen ubikinon ailesinden bir bileşiktir (20,21). Mitokondrinin iç membranında yer almakta ve ATP sentezindeki elektron taşıma zincirinde ko-faktör olarak rol oynamaktadır. Kuvvetli bir antioksidan olan Co-enzim Q₁₀ enerji üretimi sırasında oluşan reaktif oksijen türlerine karşı da hücre sel koruyucu ve lipit peroksidasyonu durdurucu bir moleküldür (22,23). İnsanlarda Co-enzim Q₁₀ miktarının yaşa ve bazı hastalıklara bağlı olarak azalma gösterdiği tesbit edilmiştir. Kalp yetmezliği, kalp zayıflığı ve damar sertliği olan insanlarda Co-enzim Q₁₀ düzeyinin çok düşük olduğu bildirilmiştir (24). Diğer taraftan, Co-enzim Q₁₀'un metabolizma üzerinde enerji üretimini arttırıcı olarak, kas güçlendirici olarak, bağışıklık sistemi destekleyicisi, kalp sağlığını korumada ve hipertansiyonda destek olarak kullanılabileceği bildirilmektedir (25).

Bu çalışmada bir nitrik oksit sentetaz enzim inhibitörü olan L-NAME ile oluşturulan kronik deneysel hipertansif ratlarda ACE inhibitörü ile birlikte L-karnitin ve Co-enzim Q₁₀ verilmesinin plazma ve kalp dokusunda total oksidan sistem ve total antioksidan sistem üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı.

MATERYAL ve METOT

Hayvan Materyali

Çalışmada ortalama 200-250 gr ağırlığında 8 haftalık Sprague-Dawley cinsi toplam 60 adet rat kullanıldı. Ratlar 12 saat gün ışığı/12 saat karanlık standart ışık altında, 25°C ısıda, *ad libitum* su ve yem ile toplam 38 gün süreyle beslendi. Bu araştırma için Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan çalışma izni alındı (Karar Sayı No: 2010-21).

Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada kullanılan 60 rat iki kontrol dört deney grubu olacak şekilde ayrıldı. 10 gün süreyle intraperitoneal olarak 75 mg/kg L- NAME (26) verilerek ratlar hipertansif duruma getirildi. Ratlar hipertansif yapıldıktan sonra, kontrol ve deney gruplarına Tablo 1'de gösterildiği şekilde uygulama yapıldı.

Tablo 1. Hipertansif kontrol ve deney grubundaki ratlara yapılan uygulamalar.

Table 1. Applications that made rats in hypertensive control and the experimental group.

GRUPLAR	
(n=10)	(n=10)
KONTROL 1 14 gün süreyle intraperitoneal olarak 10 mg/kg ACE inhibitörü uygulaması (27)	KONTROL 2 28 gün süreyle intraperitoneal olarak 10 mg/kg ACE inhibitörü uygulaması
L-KARNİTİN 1 14 gün süreyle intraperitoneal olarak 10 mg/kg ACE inhibitörü + 100 mg/kg L-Karnitin uygulaması (28)	L-KARNİTİN 2 28 gün süreyle intraperitoneal olarak 10 mg/kg ACE inhibitörü + 100 mg/kg L-karnitin uygulaması
Co-ENZİM Q ₁₀ 1 14 gün süreyle intraperitoneal olarak 10 mg/kg ACE inhibitörü + 100 mg/kg Co-Enzim Q ₁₀ uygulaması (29)	Co-ENZİM Q ₁₀ 2 28 gün süreyle intraperitoneal olarak 10 mg/kg ACE inhibitörü + 100 mg/kg Co-Enzim Q ₁₀ uygulaması

Deney süresi sonunda hayvanlardan kan ve kalp numuneleri alındı. İntrakardiyal yolla EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri +4 °C, 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Plazmalar polietilen tüplere konularak ve alınan doku örnekleri ise naylon poşetlerin içinde -20 °C'de saklandı.

Biyokimyasal Analizler

Plazma ve Doku Antioksidan ve Oksidan Düzeylerinin Belirlenmesi

Plazma ve dokulardaki antioksidan ve oksidan miktarı Total Antioksidant Status (TAS) Assay Kit ve

Total Oksidant Status (TOS) Assay Kit (Rel Assay Diagnostics, Clinical Chemistry Solutions, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak spektrofotometre (PowerWave XS, BioTek, Instruments, USA) ile ölçüldü (30).

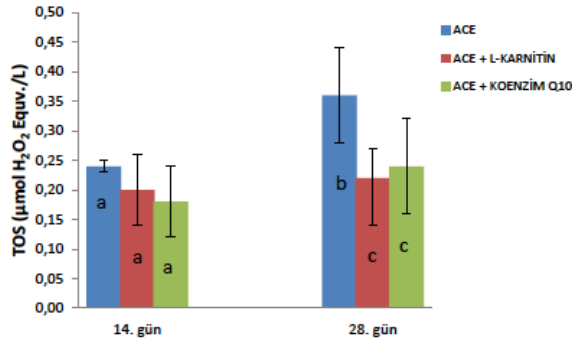
İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeler SPSS 16.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Her grubun başlangıç değerlerine göre zaman dilimindeki değişimlerini kıyaslamak amacıyla Anova–Tukey testi kullanıldı. Sonuçlar, ortalama±standart sapma ($X\pm SD$) olarak belirlendi ve $P<0.05$ istatistiksel farklılığı gösterdi.

BULGULAR

Plazma Total Oksidan Düzeyleri

Grupların plazma total oksidan düzeylerinde belirlenen değişimler şekil 1’de verildi. Plazma total oksidan düzeyleri gruplara göre kıyaslama yapıldığında, 14. günde kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak değişiklik tespit edilmedi. Yirmisekizinci günde ise kontrol grubuna göre hem L-karnitin hem de Co-enzim Q₁₀ uygulanan grupların total oksidan düzeylerinin istatistiksel olarak önemli düzeyde düşük olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Plazma Total oksidan düzeyleri grupların kendi içinde günlere göre kıyaslandığında kontrol grubunun 28. günde 14. güne göre Total oksidan düzeyinin istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi. L-karnitin ve Co-enzim Q₁₀ gruplarının Total oksidan düzeylerinde günlere göre istatistiksel bir fark saptanmadı.

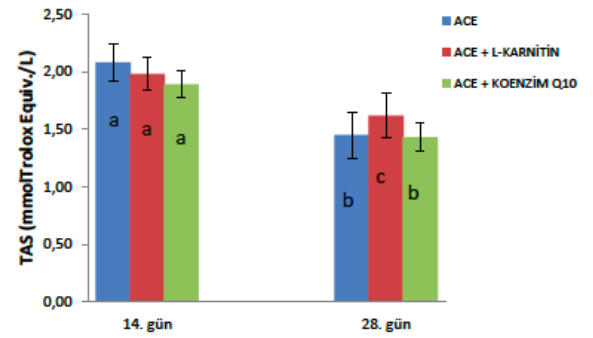


Şekil 1. Plazma Total Oksidan Düzeyleri. ^{a-b}, ^{b-c}: $P<0.05$, ^{a-c}: $P>0.05$

Figure 1. Plasma Total Oxidant Levels. ^{a-b}, ^{b-c}: $P<0.05$, ^{a-c}: $P>0.05$

Plazma Total Antioksidan Düzeyleri

Plazma total antioksidan düzeylerinde belirlenen değişimler şekil 2’de gösterildi. Plazma total antioksidan düzeylerinde 14. ve 28. günlerde gruplar arasında istatistiksel olarak bir farklılık tespit edilmedi. Gruplar kendi içinde günlere göre kıyaslandığında, 14. güne göre 28. günde tüm grupların plazma total antioksidan düzeylerinde önemli bir düşüş olduğu ($P<0.001$) belirlendi.

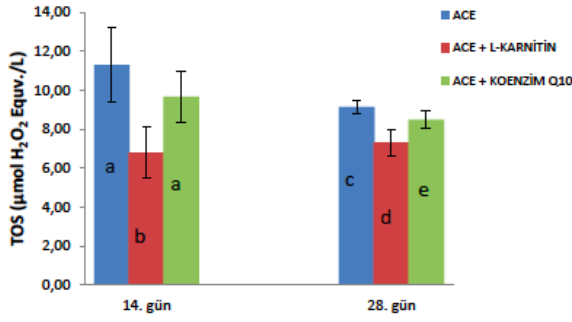


Şekil 2. Plazma Total Antioksidan Düzeyleri. ^{a-b}: $P<0.001$, ^{a-c}: $P<0.01$, ^{b-c}: $P>0.05$

Figure 2. Plasma Total Antioxidant Levels. ^{a-b}: $P<0.001$, ^{a-c}: $P<0.01$, ^{b-c}: $P>0.05$

Kalp Dokusu Total Oksidan Düzeyleri

Kalp dokusu total oksidan düzeylerine ait belirlenen değişimler şekil 3’de verilmiştir. On dördüncü günde kalp dokusu total oksidan düzeylerinin kontrol grubuna göre L-karnitin uygulanan grupta istatistiksel olarak daha düşük olduğu ($P<0.001$), Co-enzim Q₁₀ uygulanan grupta ise istatistiksel olarak önemli bir fark göstermediği belirlendi. Yirmi sekizinci günde kalp dokusu total oksidan düzeylerinin kontrol grubuna göre Co-enzim Q₁₀ uygulanan grupta da ($P<0.05$) L-karnitin uygulanan grupta da ($P<0.001$) istatistiksel olarak düşük olduğu görüldü. Gruplar kendi içinde günlere göre kıyaslandığında, 14. güne göre 28. günde kontrol ($P<0.01$) ve Co-enzim Q₁₀ grubunun ($P<0.05$) kalp dokusu total oksidan düzeylerinin belirgin derecede düştüğü tespit edildi.

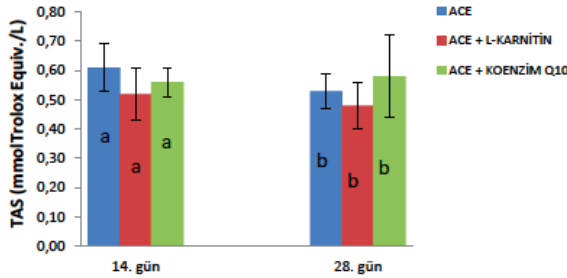


Şekil 3. Kalp Dokusu Total Oksidan Düzeyleri. ^{a-b, c-d, e-d}: P<0.001, ^{a-c}: P<0.01, ^{a-e}: P<0.05, ^{b-d}: P>0.05

Figure 3. Total Oxidant Levels of Heart Tissue. ^{a-b, c-d, e-d}: P<0.001, ^{a-c}: P<0.01, ^{a-e}: P<0.05, ^{b-d}: P>0.05

Kalp Dokusu Total Antioksidan Düzeyleri

Kalp dokusu total antioksidan düzeylerinde belirlenen değişimler şekil 4'de gösterildi. Kalp dokusu total antioksidan düzeylerinde gruplar arasında ve grup içinde yapılan kıyaslamada her iki zaman diliminde de istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilmedi.



Şekil 4. Kalp Dokusu Total Antioksidan Düzeyleri. ^{a-b}: P>0.05

Figure 4. Total Antioxidant Levels of Heart Tissue. ^{a-b}: P>0.05

TARTIŞMA ve SONUÇ

Nitrik oksidin endotel hücreleri tarafından sabit şekilde salınması, arterlerin normal tonusunun ve kan basıncının ayarlanmasında önemli bir role sahiptir. L-NAME, nitrik oksit sentaz etkinliğini engelleyerek kan basıncını yükseltmesi dolayısıyla, deneysel hipertansiyon oluşturulmasında sıklıkla

kullanılmaktadır (31). NOS'un işlevinin engellenmesinin Ang II'ye karşı olan damar cevabını artırdığı ve böylece Ang II'nin normal miktarlarının bile L-NAME verilen sıçanlarda vazokonstriksiyonu uyurabileceği ve dolayısıyla kan basıncını artırabileceği de bildirilmiştir (32). Diğer taraftan, ACE inhibitörleri günümüzde etkili ve güvenilir antihipertansif ve vasküloprotektif olarak klinik kullanımda yerlerini almışlardır (1). Yapılan kontrollü ve karşılaştırılmalı bir çalışmada ACE'nin bloke edilmesinin, kalp ve böbrek üzerinde koruyucu etkisinin olduğu ve beta blokörler ve kalsiyum kanal blokörleri gibi diğer antihipertansif ilaçlardan daha üstün olduğu gösterilmiştir (9). ACE inhibitörlerinin renoprotektif, kardiyoprotektif ve vasküloprotektif olmasının altında yatan neden, antihipertansif etkisinden bağımsız olarak Ang II uyarımlı enflamasyonu azaltması ve aynı zamanda hücrel apoptozu engellemesi ve oksidatif stresi azaltması şeklinde gösterilmiştir (1). Sunulan çalışmada, hipertansiyon sonucu plazma ve kalp dokusunda oksidan-antioksidan sistemde belirgin değişikliklerin ortaya çıktığı, artmış oksidasyon verilerine karşı antioksidan sistemde belirgin bir düşüş olduğu tespit edilmiştir. Hipertansiyon sonucu artan serbest radikallerin antioksidan sistemi tüketmesi ile bu dengenin kurulduğu ve hipertansiyonun endojen antioksidan seviyelerindeki azalmayla ilişkili olabileceği de düşünülmektedir. Süperoksit radikal tutucuların, vazodilatör etkinliğinin mekanizması henüz yeteri kadar iyi bilinmemektedir. Bununla birlikte, süperoksit tutucularının endotel bağımlı vazodilatasyonu ve NO salınımını artırarak spontan hipertansiyonu düşürdükleri ve hipertansif ratlarda süperoksit radikalının damar duvarında arttığı ve süperoksit radikalının NO'yu inaktive ederek, vazodilatör etkisini azalttığı bildirilmiştir (33,34).

Bu çalışmada, arteriyal kan basıncında meydana gelen artışın oksidatif stres göstergelerinin yükselmesiyle birlikte, antioksidan kapasitesinin düşmesine sebep olduğu belirlenmiştir. Miguel-Carrasco ve ark. (35) oksidatif stres göstergelerinde meydana gelen değişkenliğin, özellikle SOD ve GSH-

Px gibi antioksidan enzim genlerinin yapımının baskılanması şeklinde ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, L-karnitin kullanılması hücrel antioksidan enzim yapımını arttırdığını, dolayısıyla oksidasyon reaksiyonlarına karşı koruyucu etkinliği kuvvetlendirdiğini de ifade etmişler ve hipertansif ratlara L-karnitin verilmesinin oksidatif stresi azaltıcı etkinliği ne kadar yüksek olursa olsun, kan basıncında meydana getirdiği düzeltmenin hiçbir zaman normal seviyelere ulaşmayacağını vurgulamışlardır. Sunulan bu çalışmada da, L-karnitin uygulanmasının plazma oksidan seviyesini değişmeden tuttuğu, antioksidan düzeylerinde ise düşmeye engel olamadığı belirlendi. Bu sonuçlar L-karnitin iyi bir serbest radikal tutucusu olmakla birlikte, antioksidan sistem üzerine olan etkisinin yeterince kuvvetli olmadığını göstermektedir.

Yaşlanma, arteroskleroz, hiperlipidemi, renal bozukluklar ve hipertansiyon gibi hastalıklar, oksidatif stresin artmasıyla karakterize patolojik durumlardır (36). Oksidatif stresin de hipertansiyonun patogenezinin sorumlu olduğu, L-karnitinin terapötik maksatla kullanımının kardiyovasküler ve renal arteriyal hipertansiyona karşı koruyucu olabileceği bildirilmektedir (37). Yapılan bir çalışmada hipertansif ratlarda L-karnitin antioksidan etkinliği ile RAS'ı inhibe ederek antioksidan enzimlerin moleküler düzenlenmesine katkı sağladığı bildirilmiştir (35). Son yıllarda yapılan çalışmalar L-karnitin verilmesinin insülin direnci, Tip 2 diyabet, dislipidemi, kardiyovasküler hastalıklar ve hipertansiyon gibi pek çok hastalıkta önemli etkilerinin olduğunu göstermiştir (17,18,38). Diğer taraftan Gomez-Amores ve ark. (39), L-karnitin, hipertansif ratlarda oksidatif stresi azalttığını, ancak kan basıncında bir değişiklik oluşturmadığını bildirmişlerdir. Bazı araştırmacılar L-karnitin antioksidan etkinliğinin kardiyovasküler hastalıkların düzeltilmesinde önemli bir etkiye sahip olduğunu söylemektedirler (36,40,41). Sunulan çalışmada, kalp dokusunda antioksidan düzeyleri değişmez kalırken, oksidan düzeylerinin yükseldiği saptandı. Buradan yola çıkarak, L-Karnitin kalp dokusunda antioksidan

sistemi destekleyici özelliğinin kuvvetli olması sebebiyle iyi bir kardiyoprotektif ajan olduğu söylenebilir.

Co-enzim Q₁₀ mitokondriyal solunum zincirinde, NADH, süksinat dehidrogenaz ve sitokrom sistemi arasında elektron transportuna aracılık eden oksidatif fosforilasyonun önemli bir komponentidir (25). Son yıllarda yapılan çalışmalarda Co-enzim Q₁₀'nun yalnızca solunum zincirinin esansiyel bir üyesi olmadığı aynı zamanda güçlü antioksidan özelliğe sahip olduğu da gösterilmiştir (22,42). Co-enzim Q₁₀, membranda doymamış lipid zincirinin çok yakınına yerleşmiş olup serbest radikallerin primer temizleyicisi olarak görev yapar. Co-enzim Q₁₀'nun hücre membranındaki büyük kısmı kinol formunda olduğundan çok etkili bir antioksidandır. Biyosentezin azalması, yıkımın artması, membran lipidlerinde kinon hareketini engelleyen değişiklikler, Co-enzim Q₁₀ miktarında azalmaya neden olabilir (22). Co-enzim Q₁₀, vücudun enerji üretiminde rol alır. Bu hayati rolü nedeni ile her hücrede bulunur. Özellikle kalp hücrelerinde fazlaca bulunur ve kalbin sağlıklı çalışmasına yardımcı olur (24). Kalp yetmezliği, kalp zayıflığı ve damar sertliği olan insanlarda Co-enzim Q₁₀ düzeyinin çok düşük olduğu belirlenmiştir (24). Bu parametre, arterlerin işlev ve yapısının değerlendirilmesi, kalp-damar hastalıklarının tahmini ve tedavi başarısı için yol gösterici olabilmektedir. Shargorodsky ve ark. (42), Co-enzim Q₁₀'nun da içinde bulunduğu kompleks bir antioksidan tedavisi alan ve önemli birçok kardiyovasküler risk faktörleri olan hastalarda büyük ve küçük damar elastikiyetinin arttığını bildirmişlerdir. Bu yararlı vasküler etki glikoz ve lipid metabolizmasındaki iyileşmenin yanı sıra kan basıncındaki azalma ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan bazı deneysel çalışmalar, özellikle yaşlı hastalarda kalbin strese maruz kaldığı durumlarda Co-enzim Q₁₀ verilmesinin miyokartta koruyucu bir etki yarattığını göstermiştir (43,44). Ayrıca, Co-enzim Q₁₀'un mitokondriyal verimliliği arttırdığı ve miyokardın hipoksi-reoksijenizasyonuna bağlı olarak gelişen strese karşı toleransını arttırdığı bildirilmiştir. Sunulan bu çalışmada, hipertansif ratlarda plazma

oksidan düzeylerinin, Co-enzim Q₁₀ uygulamasıyla değişmediği, antioksidan seviyelerinin ise düştüğü ortaya konuldu. Ayrıca, Co-enzim Q₁₀ verilen hipertansif ratlarda, kalp dokusu antioksidan seviyelerinde bir değişiklik belirlenmezken, oksidan düzeylerinin belirgin şekilde düştüğü saptandı. Bu sonuçlar, Co-enzim Q₁₀'nun iyi bir radikal tutucusu olduğunu ve kalp dokusu için stres azaltıcı etkinliğinin kuvvetli olduğunu göstermektedir.

Bu çalışma ile, L-NAME hipertansif ratlara ACE inhibitörü ile birlikte L- karnitin veya Co enzim Q₁₀ verilmesinin ratların oksidan düzeylerini düşürücü ve antioksidan düzeylerini koruyucu rol oynadığı ve bu özellikleri dolayısıyla L-karnitin ve Co-enzim Q₁₀'nun hipertansiyonda kalbi ve damar sistemini serbest radikal hasarından koruyarak, oluşacak ikincil problemlerin şiddetini azaltabilecekleri kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Cohuet G., Struijker-Bouder H., 2006. Mechanism of target organ damage caused by hypertension: Therapeutic potential. *Pharm Therap*, 111, 81-98.
2. Yılmaz G., Aksulu HE., Demirel E., Ercan ZS., Zengil H., Türker RK., 1987. Modulation by endothelium of the vascular effects of angiotensin II. *Agents Actions*, 21, 184-190.
3. Rochette L., Lorin J., Zeller M., Guillard JC., Lorgis L., Cottin Y., Vergely C., 2013. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: Possible therapeutic targets?. *Pharm Therap*, 140, 239-257.
4. Landmesser U., Dikalov S., Price SR., McCann L., Fukai T., Holland SM., Mitch WE., Harrison DG., 2003. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*, 111, 1201-1209.
5. Magy L., Vincent F., Faure S., Messerli FH., Wang JG., Achard JM., Fournier A., 2005. The renin-angiotensin systems: evolving pharmacological perspectives for cerebroprotection. *Curr Pharm Des*, 11, 3275-3291.
6. Arı UÇ., Kamiloğlu NN., 2015. Erkek sığırlarda ürogenital sistem anatomisi ve fizyolojisi. *Türk Klin J Vet Sci-Surg- Special Topics*, 1, 1-11.
7. Kurusaki R., Muramatsu Y., Kato H., Watanabe Y., Imai Y., Itoyama Y., Araki T., 2005. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitor perindopril on interneurons in MPTP-treated mice. *European Neuropsychopharmacology*, 15, 57-67.
8. Lopez-Real A., Rey P., Soto-Otero R., Mendez-Alvarez E., Labandeira-Garcia JL., 2005. Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces oxidative stress and protects dopaminergic neurons in a 6 hydroxydopamine rat model of Parkinsonism. *J Neurosci Res*, 81, 865-873.
9. Wright JT., Bakris G., Greene T., Agodoa LY., Appel LJ., Charleston J., Cheek D., Douglas-Baltimore JG., Gassman J., Glassock R., Hebert L., Jamerson K., Lewis J., Phillips RA., Toto RD., Middleton JP., Rostand SG., 2002. Effect of blood pressure lowering and antihypertensive drug class on progression of hypertensive kidney disease: results from the AASK trial. *J Am Med Assoc*, 288, 2421-2431.
10. Taşar N., Şehirli Ö., Yiğiner Ö., Süleymanoğlu S., Yüksel M., Yeğen B., Şener G., 2012. Protective effects of *Nigella sativa* against hypertension-induced oxidative stress and cardiovascular dysfunction in rats. *Marmara Pharmaceu J*, 16, 141-149.
11. Hopkins RZ., 2016. Reactive Oxygen Species. *Cell Med Press*, 2, 290-297.
12. Halliwell B., Gutteridge JMC., 2015. Free radicals in biology and medicine, 15. Baskı, Oxford University Press, pp. 639-695.
13. Deng K., Wong CW., Nolan JV., 2006. Long-term effects of earlylife dietary L-carnitine on lymphoid organs and immune responses in Leghorn-type chickens. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 90, 81-86.
14. Karadeniz A., Şimsek N., Çakır S., 2008. Haematological effects of dietary L-carnitine

- supplementation in broiler chickens. *Revue Med Vet*, 8, 437-443.
15. Jogl G., Hsiao YS., Tong L., 2004. Structure and function of carnitine acyltransferases. *Ann NY Acad Sci*, 1033, 17-29.
 16. Ribas GS., Biancini GB., Mescka C., Wayhs CY., Sitta A., Wajner M., Vargas CR., 2012. Oxidative stress parameters in urine from patients with disorders of propionate metabolism: A beneficial effect of L-carnitine supplementation. *Cell Mol Neurobiol*, 32, 77-82.
 17. Ribas GS., Vargas CR., Wajner M., 2014. L-carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders. *Gene*, 533, 469-476.
 18. Calo LA., Pagnina E., Davisb PA., Semplicinia A., Nicolaic R., Calvanic M., Pessinac AC., 2006. Antioxidant effect of L-carnitine and its short chain esters relevance for the protection from oxidative stress related cardiovascular damage. *Int J Cardiol*, 107, 54-60.
 19. Gülçin İ., 2006. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci*, 78, 803-811.
 20. Kubo H., Fujii K., Kawabe T., Matsumoto S., Kishida H., Hosoe K., 2008. Food content of ubiquinol-10 and ubiquinone-10 in the Japanese diet. *J Food Compos Anal*, 21, 199-210.
 21. Parkhideh D., 2008. Methods and compositions that enhance bioavailability of coenzyme-Q10, United States Patent No: 7, 438, 903, Oct. 21.
 22. Gürkan AS., Bozdağ-Dündar O., 2005. Coenzyme Q10. *J Fac Pharm*, 34, 129-154.
 23. Loster H., Bohm U., 2001. L-carnitine reduces malondialdehyde concentrations in isolated rat hearts in dependence on perfusion conditions. *Mol Cell Biochem*, 217, 83-90.
 24. Şener G., Paskaloğlu K., Satiroglu H., Alican I., Kaçmaz A., Sakarcın A., 2004. L-carnitine ameliorates oxidative damage due to chronic renal failure in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 43, 698-705.
 25. Ercan P., El SN., 2010. Koenzim Q10'un beslenme ve sağlık açısından önemi ve biyoyararlılığı. *TÜBAV Bil Derg*, 3, 192-200.
 26. Doggrell SA., Brown L., 1998. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res*, 39, 89-105.
 27. Cachofeiro V., Sakakibara T., Nasjletti A., 1992. Kinins, nitric oxide, and the hypotensive effect of captopril and ramiprilat in hypertension. *Hypertension*, 19, 138-145.
 28. Winter BK., Fiskum G., Gallo LL., 1995. Effects of L-carnitine on serum triglyceride and cytokine levels in rat models of cachexia and septic shock. *Br J Cancer*, 72, 1173-1179.
 29. Ankola DD., Viswanad B., Bhardwaj V., Ramarao P., Kumar MR., 2007. Development of potent oral nanoparticulate formulation of coenzyme Q10 for treatment of hypertension: can the simple nutritional supplements be used as first line therapeutic agents for prophylaxis/therapy?. *Eur J Pharm Biopharm*, 67, 361-369.
 30. Erel O., 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*, 37, 277-285.
 31. Li H., Förstermann U., 2013. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Cur Opin Pharm*, 13, 161-167.
 32. Benter IF., Yousif MHM., Anim JT., Cojocel C., Diz DI., 2006. Angiotensin-(1-7) prevents development of severe hypertension and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats treated with L-NAME. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290, 684-691.
 33. Baradaran A., Nasri H., Rafieian-kopaei M., 2014. Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. *J Res Med Sci*, 19, 358-367.
 34. Rodrigo R., Prat H., Passalacqua W., Araya J., Bachler JP., 2008. Decrease in oxidative stress through supplementation of vitamins C and E is associated with a reduction in blood pressure in patients with essential hypertension. *Clin Sci*, 114, 625-634.
 35. Miguel-Carrasco JL., Monserrat Maria T., Mate A.,

- Vazquez CM., 2010. Comparative effects of captopril and L-carnitine on blood pressure and antioxidant enzyme gene expression in the heart of spontaneously hypertensive rats. *Europ J Pharmacol*, 632, 65-72.
36. Rajasekar P., Palanisamy N., Anuradha CV., 2007. Increase in nitric oxide and reductions in blood pressure, protein kinase C beta II and oxidative stress by L-carnitine: a study in the fructose-fed hypertensive rat. *Clin Exp Hypertens*, 29, 517-530.
37. Mate A., Miguel-Carrasco JL., Vazquez CM., 2010. The therapeutic prospects of using L-carnitine to manage hypertension-related organ damage. *Drug Disc Today*, 15, 484-492.
38. Arduini A., Bonomini M., Savica V., Amato A., Zammit V., 2008. Carnitine in metabolic disease: potential for pharmacological intervention. *Pharm Therap*, 120, 149-156.
39. Gomez-Amores L., Mate A., Miguel-Carrasco JL., Jimenez L., Jos A., Camean AM., Revilla E., Santa-Maria C., Vazquez CM., 2007. L-carnitine attenuates oxidative stress in hypertensive rats. *J Nutr Biochem*, 18, 533-540.
40. Koeth RA., Wang Z., Levison BS., Buffa JA., Org E., Sheehy BT., Britt EB., Fu X., Wu Y., Li L., Smith JD., Di Donato JA., Chen J., Li H., Gary D Wu., Lewis JD., Warrier M., Brown JM., Krauss RM., Tang WHW., Bushman FD., Lusis AJ., Hazen SL., 2013. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med*, 19, 576-588.
41. Ferrari R., Merli, E., Cicchitelli G., Mele D., Fucili A., Ceconi C., 2004. Therapeutic Effects of L-carnitine and propionyl-L-carnitine on cardiovascular diseases: A review. *Annals NYA Sci*, 1033, 79-91.
42. Shargorodsky M., Debby O., Matas Z., Zimlichman R., 2010. Effect of long-term treatment with antioxidants (vitamin C, vitamin E, coenzyme Q10 and selenium) on arterial compliance, humoral factors and inflammatory markers in patients with multiple cardiovascular risk factors. *Nutr Metab*, 7, 55.
43. Banach M., Serban C., Sahebkar A., Ursoniu S., Rysz J., Muntner P., Toth PP., Jones SR., Rizzo M., Glasser SP., Gregory YH., Dragan S, Mikhailidis DP., 2015. Effects of coenzyme Q10 on statin-induced myopathy: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Mayo Clin Proc*, 90, 24-34.
44. Mortensen SA., Rosenfeldt F., Kumar A., Dolliner P., Filipiak KJ., Pella D., Alehagen .U, Steurer G., Littarru GP., 2014. The effect of coenzyme Q10 on morbidity and mortality in chronic heart failure: results from Q-SYMBIO: a randomized double-blind trial. *J Am Coll Card Heart Failure*, 2, 641-649.



Koyun ve Keçi Sütlerinde *Coxiella burnetii* Varlığının PCR ile Araştırılması

Ayşe KILIÇ¹✉

1. Fırat Üniversitesi, Sivrice Meslek Yüksekokulu, Elazığ, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
08.06.2016	06.03.2017	30.10.2017

Öz: Q humması, büyük ölçüde geniş getiren hayvanların süt, vajinal mukus ve dışkı gibi ürünlerle dışarıya saçtığı *Coxiella burnetii* bakterisinin neden olduğu zoonotik bir hastalıktır. Sığır, koyun ve keçiler etkenin insanlara bulaşmasında primer rezervuar konakçılardır. Bu çalışmada abort yapan ve yapmayan farklı koyun ve keçi sürülerinden toplanan 120 süt örneği, *C.burnetii* suşunun transpozon repetitive gen bölgesinden türetilen tür spesifik Trans 1 ve 2 primerleri kullanılarak PZR amplifikasyonuna maruz bırakıldı. Elazığ ve komşu illerden toplanan sütlerde abort yapmış koyunlarda %10 ve abort yapmış keçilerde ise %3.33 oranında *C.burnetii* DNA'sı PZR ile pozitif olarak tespit edildi. Abort yapmayan sürülerden alınan koyun ve keçi sütü örneklerinde PZR testi ile pozitiflik saptanmadı. Sonuç olarak abortus öyküsü olan ve olmayan koyun ve keçi sürülerinden toplanan süt örneklerinde *C.burnetii* enfeksiyonunun moleküler yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *C. burnetii*, PZR, Süt.

The Investigation of Presence *Coxiella burnetii* in Sheep and Goat Milk by the PCR

Abstract: Q fever is a zoonotic disease caused by *Coxiella burnetii* bacteria, which shedding into largely ruminant animals with products such as milk, vaginal mucus and stools. Cattle, sheep and goats are primary *C. burnetii* reservoir hosts. In this study, 120 milk samples were collected from different sheep and goat herds which aborting and non-aborting and A PCR was performed with Trans 1 and Trans 2 primers derived from transposon repetitive gen region. The milk samples obtained from herds belonging aborted sheep in Elazığ and neighboring provinces showed a total of 10% were detected positivity, whereas the 3.33% milk sample taken from aborted goat herds were observed *C. burnetii* as positive by the PCR. The milk samples taken from non-aborted sheep and goat herds weren't observed positivity by the PCR test. As a result, it is aimed to investigate *C.burnetii* infection in goat and sheep milk samples obtained from belonging aborted and non-aborted flocks by molecular methods.

Keywords: *C.burnetii*, Milk, PCR.

GİRİŞ

C.burnetii hücre içine yerleşen, kok-çomak arası pleomorfik, gram negatif bir mikroorganizmadır (1-3). Sığır, koyun ve keçiler *C. burnetii* primer rezervuar konakçılarıdır (4). Hayvanlarla temas eden kişiler, veterinerler, tarım işçileri, mezbaha işçileri ve enfekte hayvanlarla çalışan laboratuvar personeli yüksek risk altındadır (5-7). Hastalığın akut döneminde akciğer, dalak, kan ve karaciğerden sıklıkla izole edilen bakteri, kronik dönemde uterus ve meme bezlerine yerleşmektedir. Kronik Q ateşinin en sık görülen patolojik bulguları arasında abortlar ve ölü doğumlar vardır (2,8). Enfekte hayvanlar bakteriyi çevreye idrar, dışkı, süt ve doğum çıkartıları ile etrafa bulaştırırlar. İnsanlar kontamine aerosollerin solunması ile veya çiğ süt ve süt ürünleri tüketimi ile enfekte olurlar (9,10). Son yapılan çalışmalarda, keçilerin süt yoluyla etkeni attıkları, koyunların ise vajinal mukus ya da dışkı ile dışarı attıkları bildirilmiştir (10-12).

Q humması tanısı genellikle serolojik testler ile yapılmaktadır. Serolojik tanıda mikrooglitinasyon, kompleman fiksasyon testi (KFT), indirekt floresans antikor testi ve ELISA testleri kullanılmaktadır ve IFA tekniği referans metod olarak önerilmektedir (13-15). Ancak serolojik pozitiflik hastalığın bulunduğunu göstermez. Oysa bakteri izolasyonu hastalığın varlığını kesin olarak açıklar. *C. burnetii* izolasyonu uzun, zor ve kültürünün yapılması tehlikeli olduğundan, bu etken izolasyonu için "biyogüvenlik düzey 3" koşula gereksinim duyulmaktadır (16). Laboratuvar muayeneleri için yavru atma veya doğumdan hemen sonra atık yavru, plasenta ve vajinal akıntılar gibi örnekler alınmalıdır. Ayrıca memeden ve süt toplama tanklarından alınan süt, kolostrum veya gaita örnekleri de hastalığın teşhisi için değerlendirilebilecek örneklerdendir (3,17). Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), son derece hassas olan ve süt, dışkı ve vajinal svabda bakteri varlığını belirlemede tarama için kullanılan spesifik tespit yöntemidir (5,18,19).

Bu çalışma, Elazığ ve komşu illerden abort öyküsü olan ve olmayan koyun ve keçi sürülerinden toplam 120 adet süt örneği toplanarak, moleküler yöntemlerden biri olan PZR metodu ile *C. burnetii* varlığı açısından araştırılması amacıyla yapılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Süt örneklerinden bakteriyel DNA, Berri ve ark. 'larının (19) bildirdiği şekilde bazı modifikasyonlar ile ekstrakte edildi. Bu amaçla laboratuvara getirilen süt örnekleri 3000 g' de 10 dakika süre ile 3 kez santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atılarak pelet yıkandı ve 50 ul distile su içinde iki kez yeniden süspansiyon haline getirdi. Daha sonra, DNA ekstraksiyon QIAamp kiti imalatçı firma talimatlarına göre (Qiagen, Hilden, Almanya) süt numuneleri için uygulandı. Laboratuvara getirilen süt örneklerinden DNA izolasyonu QIAamp DNA kitinde (Qiagen S.A., France) belirtilen prosedüre göre yapıldı. Primer olarak *C. burnetii* suşunun transpozon repetitive bölgesinden türetilen tür spesifik Trans-1 (5'-TAT GTA TCC ACC GTA GCCAGT C-3') and trans-2 (5'-CCC AAC AACACC TCC TTATTC-3') (20) primer çifti kullanıldı. DNA amplifikasyonu 95 °C'de 2 dakika ön ısıtmayı müteakip 5 siklus 94 °C'de 30 saniye denatürasyon, 61 °C'de 30 saniye hibridizasyon, 72 °C'de 1 dakika sentez olmak üzere gerçekleştirildi. Bunu takiben 40 siklus; 94 °C'de 30 saniye, 61 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 1 dakika olmak üzere ısı işlemleri uygulandı. Son siklus ise 72 °C'de 10 dakika olarak programlandı (21). PCR'de amplifiye edilen DNA, %1.5'lük agaroz jel içerisinde 100 voltta 1 saat süreyle elektroforez işlemine tabi tutuldu. Elektroforezi mütakip jel ethidium bromide (0.5 µg/ml) ile boyandı ve sonuçlar UV transilluminatörde değerlendirildi. PCR ürünlerinden elde edilen 687 bp uzunluğundaki bant *C. burnetii* yönünden pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 1). Moleküler çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan *C. burnetii* referans suşu Dr. Mustapha Berri (Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), France)' den temin edildi.

BULGULAR

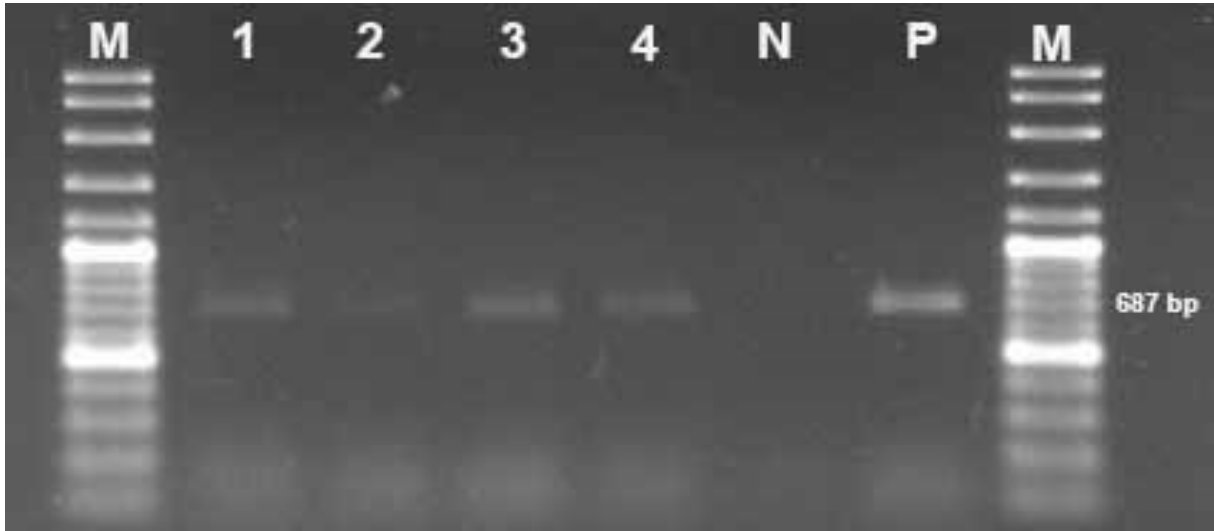
Bu çalışmada Elazığ ve civar illerinde halk elindeki özel üretim yapan işletmelerden abort öyküsü olan koyun ve keçi sürülerinin herbirinden 30 süt örneği, abort öyküsü olmayan koyun ve keçi sürülerinin herbirinden 30 süt örneği olmak üzere toplam 120 süt örneği toplanarak PCR testi ile *C. burnetii* varlığı yönünden incelendi. Bu örnekler, abort ihbarı yapılmış ve sağlıklı koyun ve keçi sürüleri içerisinde tesadüfi örnekleme metodu kullanılarak seçilmiştir. Yapılan incelemelerde abort yapan koyun sürülerinde 3 adet, abort yapan keçi sürülerinde ise 1 adet *C. burnetii* pozitifliği PCR metodu ile tespit edildi (Tablo 1). Abort yapmayan sürülerde (Koyun ve keçi) ise pozitiflik tespit edilmedi. Süt örneklerinden

ekstrakte edilen DNA'nın PCR'de amplifiye edilmesi ve agaraz jel elektroforez işlemine tabi tutulması sonucunda 687 bp uzunluğunda pozitif bantlar elde edildi (Şekil 1).

Tablo1. Abort öyküsü olan ve olmayan koyun ve keçi sütlerinin PCR test sonuçları.

Table 1. The PCR test results of sheep and goat milk samples with history of abortion and without history of abortion.

Abort öyküsü olanlar			Abort öyküsü olmayanlar		
Pozitif			Pozitif		
Süt(Koyun)	n	%	Süt(Koyun)	n	%
30	3	10	30	-	-
Süt(Keçi)	n	%	Süt(Keçi)	n	%
30	1	3.33	30	-	-



Şekil 1. Süt örneklerinden elde edilen *C.burnetii* DNA'sının ethidium bromide ile boyanmış %1.5'lik agaroz jel elektroforezde görünümü. M: 100 bp DNA ladder, 1, 2, 3, 4: Pozitif örnekler, N: Negatif Kontrol, P: *C.burnetii* Pozitif Kontrol.

Figure 1. Appearance on agarose gel electrophoresis (1.5%) stained with ethidium bromide of *C.burnetii* DNA extracted from the milk samples. M: 100 bp DNA ladder, 1, 2, 3, 4: Positive samples, N: Negative control, P: *C.burnetii* Positive control.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada Elazığ ve çevresinde abort yapan ve yapmayan farklı koyun ve keçi sürülerinden alınan toplam 120 süt örneği Trans 1 ve Trans 2 primerleri kullanılarak incelendi ve abort yapan koyun sürülerinde alınan süt örneklerinde %10, abort yapan

keçi sürülerinden alınan süt örneklerinde ise %3.3 oranında PCR metodu ile pozitiflik tespit edildi.

Memelilerde *C. burnetii* süt ile dışarıya çıkarılır ve böylece enfeksiyon kaynağı olarak pastörize edilmemiş süttten yapılan süt ürünleri ve çığ sütün tüketilmesi başlıca enfeksiyon kaynağı olabilir (16).

Pastörize edilmemiş süttten üretilen çiğ süt veya süt ürünleri fazla miktarda *C. burnetii* içerebilir (22).

Dünyada ve Türkiye'de çoğunlukla *C. burnetii* yaygınlık durumu serolojik çalışmalar yapılarak araştırılmıştır (23). Etkenin moleküler izolasyonu ile ilgili çalışmalar az sayıdadır. Serolojik testler *C. burnetii*'yi dışkı ve süt ile saçan hayvanları belirlemede çok fazla yeterli değildir (4). Ancak hayvanların kan, süt, plasenta, dışkı ve idrar gibi materyallerinden *C. burnetii* izole etmekle enfeksiyon varlığı açıklanabilir (2,24). Mohammed ve ark. (25) tarafından yapılan bir çalışmada farklı hayvan türlerinden elde edilen 148 süt örneğinden 16 örneğin (%10.8), *C. burnetii* DNA'sı pozitif amplifikasyon verdiği ve bu örneklerin 11 tanesinin ineklerde, diğerlerinin ise beş deve de tespit edildiği bildirilmiştir.

Yapılan çalışmalarda koyunların genital svab, süt ve dışkı örneklerinde, İran'da pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinde etken tespiti ve kadınlarda aniden oluşan abort vakalarında klinik örneklerde *C. burnetii* doğrudan saptanması için, trans-PCR'in son derece spesifik ve duyarlı olduğu bulunmuştur (22,26,27). İran'ın Kuzey-Doğu'sunda yapılan bir çalışmada 23 koyun sütü örneğinin 8 (%34.78)'inde *C. burnetii* DNA'sı pozitif olarak bulunmuş, ancak 10 keçi sütü numunesinin negatif olduğu tespit edilmiştir (22). Öngör ve ark. (18) 400 koyun süt örneğinde *C. burnetii* varlığını IMS-PCR metodu ile incelemiş ve 14 (%3.5) örnekte pozitif sonuç elde etmişlerdir. Bu çalışmada özellikle abort yapan ve yapmayan koyun ve keçi süt örneklerinden elde edilen %10 ve %3.3'lük oran diğer hayvan türlerine bu etkenin nakli ve insanlara naklinde süt ile saçılımın önemli olduğunu göstermektedir. Yapılan bu çalışma özellikle epidemiyolojik çalışmalarda *Coxiella burnetii* yönünden pozitifliğin bilinmesi, hastalıklı hayvanlarla yakın ilişkide olan insanlara bulaşmasının önlenmesi bakımından büyük önem taşımaktadır.

Sonuç olarak, Bu çalışmada klinik olarak laboratuvara gönderilen süt örneklerinde *C. burnetii*'yi saptamak için mevcut PCR kitlerinden faydalanılarak, bu etkenin kısa sürede identifiye

edilmesi yönünde kullanılabileceğini göstermiştir. Ayrıca, Bu çalışmada moleküler teknikler ile Q fever için yapılan taramalarda klinik örneklerde *C. burnetii*'nin hızlı bir şekilde belirlenmesi açısından avantaj sağlanmış olup bu hastalık için kontrol önlemleri alınarak tedaviye başlama sürecinin kısılmasına katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

1. Yin MY., Qin SX., Tan QD., Feng SY., Liu GX., Zhbu DH., Zhu XQ., 2015. First report of *C. burnetii* seroprevalence in Tibetan sheep in China. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 15, 419-422.
2. Maurin M., Raoult D., 1999. Q Fever. *Clin Microbiol Rev*, 12, 518-553.
3. OIE (2010). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Chapter 2.1.12. Q Fever.
4. Arricau-Bouvery N., Rodolakis A., 2005. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis?. *Vet Res*, 36, 327-349.
5. Kırcan S., Kaya O., Tekbıyık S., Parın U., 2008. Detection of *Coxiella burnetii* in cattle by PCR. *Turk J Vet Anim Sci*, 32, 215-220.
6. Borriello G., Iovane G., Galiero G., 2010. La febbre Q negli animali domestici. *Large Anim Review*, 16, 273-283.
7. Cetinkaya B., Kalender H., Ertaş HB., Muz A., Arslan N., Öngör H., Gürcay M., 2000. Seroprevalence of coxiellosis in cattle, sheep and people in the east of Turkey. *Vet Rec*, 146, 131-136.
8. Kim SG., Kim EH., Lafferty CJ., Dubovi E., 2005. *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples, United States. *Emerg Infect Dis*, 11, 619-621.
9. Guatteo R., Beaudreau F., Berri M., Rodolakis A., Joly A., Seegers H., 2006. Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control. *Vet Res*, 37, 827-833.
10. Rodolakis A., 2009. Q fever in dairy animals. *Rickettsiology and Rickettsial diseases-5th international conference*. *Ann NY Acad Sci*, 1166, 90-93.

11. Muskens J., Wouda W., Von Bannisseht-Wijsmuller T., Van Maanen C., 2012. Prevalence of *Coxiella burnetii* infections in aborted fetuses and stillborn calves. *Vet Rec*, 170, 260-264.
12. Khalili M., Ghobadian Diali H., Norouzian Mirza H., Mosavi SM., 2015. Detection of *Coxiella burnetii* by PCR in bulk tank milk samples from dairy caprine herds in southeast of Iran. *Asian Pac J Trop Dis*, 5, 119-122.
13. Kovacova E., Kazar J., Spanelova D., 1998. Suitability of various *Coxiella burnetii* antigen preparations for detection of serum antibodies by various tests. *Acta Virol*, 42, 365-368.
14. Little TWA., 1983. Q-Fever-an Enigma. *Br Vet J*, 139, 277-283.
15. Reimer LG., 1993. Q-Fever. *Clin Microbiol Rev.*, 6, 193-198.
16. Fournier PE., Marrie TJ., Raoult D., 1998. Diagnosis of Q fever. *J Clin Microbiol*, 36, 1823-1834.
17. Ho T., Htwe KK., Yamasaki N., 1995. Isolation of *Coxiella burnetii* from dairy cattle and ticks, and some characteristics of the isolates in Japan. *Microbiol Immunol*, 39, 663-671.
18. Öngör H., Cetinkaya B., Karahan M., Açık MN., Bulut H., Muz A., 2004. Detection of *Coxiella burnetii* by immunomagnetic separation-PCR in the milk of sheep in Turkey. *Vet Rec*, 154, 570-572.
19. Berri M., Arricau-Bouvery N., Rodolakis A., 2003. PCR-based detection of *Coxiella burnetii* from clinical samples. *Methods Mol Biol*, 216, 153-161.
20. Hoover TA., Vodkin MH., Williams JC., 1992. A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. *J Bacteriol*, 174, 5540-5548.
21. Vaidya VM., Malik SVS., Bhilegaonkar KN., Rathore RS., Kaur S., Barbuddhe SB., 2010. Prevalence of Q fever in domestic animals with reproductive disorders. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 33, 307-321.
22. Khanzadi S., Jamshidi A., Razmyar J., Borji SH., 2014. Identification of *Coxiella burnetii* by touch-down PCR assay in unpasteurized milk and dairy products in North-East of Iran. *Iranian J Vet Med*, 8, 15-19.
23. Kalender H., 2001. Elazığ ve komşu illerdeki koyunlarda *Coxiella burnetii* enfeksiyonunun yaygınlığı. *Turk J Vet Anim Sci*, 25, 51-55.
24. Aitken ID., Bogel K., Cracea E., Edlinger E., Houwers D., Krauss H., Rady M., Rehacek J., Schiefer HG., Schmeer N., Tarasevich IV., Tringali G., 1987. Q Fever in Europe: current aspects of aetiology, epidemiology, human infection diagnosis and therapy. *Infection*, 15, 323-327.
25. Mohammed OB., Jarelnabi AM., Aljumaah RS., Alshaikh MA., Bakhiet AO., Omer SA., Alagaili AN., Hussein MF., 2014. *Coxiella burnetii*, the causative agent of Q fever in Saudi Arabia: molecular detection from camel and other domestic livestock. *Asian Pac J Trop Med*, 412-420.
26. Berri M., Laroucau K., Rodolakis A., 2000. The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. *Vet Microbiol*, 15, 285-293.
27. Vaidya VM., Malik SV., Kaur S., Kumar S., Barbuddhe SB., 2008. Comparison of PCR, immunofluorescence assay and pathogen isolation for diagnosis of Q fever in humans with spontaneous abortions. *J Clin Microbiol*, 46, 2038-2044.



Narenciye Kabuk Yağlarının Etlik Piliçlerde Doku Yağ Asidi Kompozisyonu ve Raf Ömrü Üzerine Etkileri*

M.Kuddusi ERHAN¹, Ş.Canan BÖLÜKBAŞI AKTAŞ²✉

1. Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Ağrı, TÜRKİYE.
2. Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootehni Bölümü, Yemler ve Hayvan Besleme Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
27.12.2016	08.03.2017	30.10.2017

Öz: Çalışma etlik piliç yemlerine farklı seviyelerde narenciye kabuk yağları (portakal, limon, bergamot) ilavesinin doku yağ asidi kompozisyonu ve raf ömrüne etkisini incelemek için yapılmıştır. Araştırmada bir günlük yaşta 500 adet (250 erkek 250 dişi) Ross 308 civciv kullanılmıştır. Denemede her biri beş alt gruptan oluşan on grup oluşturulmuştur. Kontrol grubu bazal yemle diğer gruplar ise sırasıyla bazal yeme 1, 2 ve 3 ml/kg seviyelerinde portakal, limon ve bergamot kabuk yağı ilave edilen yemlerle beslenmiştir. Deneme sonunda kesilen hayvanların göğüs ve but kaslarının yağ asit kompozisyonları ile +4 C’de depolanan dokularda 1 ve 3. günlerde tiyobarbuturik asit reaktif madde (TBARS) değerlerine bakılmıştır. Depolamanın 3.gününde 1 ml/kg düzeyinde limon ve portakal kabuk yağı ilave edilen gruplarda TBARS değerlerinin 3 mg/kg’ın altında olduğu saptanmıştır. Portakal kabuk yağının 2 ml/kg seviyesinin göğüs dokusunda 3 ml/kg seviyesinin ise but dokusunda eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA) oranını önemli derecede artırdığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak etlik piliç rasyonlarına 3 ml/kg düzeyinde portakal kabuk yağı ilavesinin dokularda raf ömrü ve yağ aside kompozisyonu üzerine olumlu etkilerinden dolayı alternatif bir yem katkı maddesi olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Etlik piliç, Narenciye kabuk yağları, TBARS, Yağ asit kompozisyonu.

The Effects of Citrus Peel Oils on Fatty Acid Composition and Shelf Life of Muscle in Broilers

Abstract: The present study was conducted to determine dietary supplemental citrus peel oils (orange, lemon, bergamot) in different levels on meat fatty acid composition and shelf -life in broilers. The trial consisted of 1-day-old total 500 (250 male and 250 female) Ross 308 chicks. The study consisted of 10 groups in total and each group had 5 subgroups. Experimental diets were prepared by adding 1, 2 and 3 ml/kg orange, lemon and bergamot peel oil to basal diet (Kontrol grubu bazal yemle diğer gruplar ise sırasıyla ifadesi cümlede yer almamakta). At the end of the study, fatty acid composition and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels of tissues stored at 4°C were measured. TBARS values were found to be below 3 mg / kg in the groups to which 1 ml / kg of lemon and orange crust oil were added on the 3rd day of storage. The addition of 2 ml/kg lemon peel oil and 3 ml/kg orange peel oil to compound feed significantly increased eicosapentaenoic acid (EPA) and docosaheksaenoic acid (DHA) in the leg and breast tissues respectively. As a conclusion, it was determined that the 3 ml/kg levels of orange peel oil, whose possible uses as an alternative to feed additives, influenced the fatty acid composition and the TBARS of the meat.

Keywords: Broiler, Citrus peel oil, Fatty acid composition, TBARS.

✉ Ş. Canan BÖLÜKBAŞI AKTAŞ

Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootehni Bölümü, Yemler ve Hayvan Besleme Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
e-posta: scananbolukbasi@hotmail.com

*"Narenciye Kabuk Yağlarının Etlik Piliçlerde Doku Yağ Asidi Kompozisyonu ve Raf Ömrü Üzerine Etkileri" başlıklı makale M.Kuddusi ERHAN'ın doktora tezinden özetlenmiştir.

GİRİŞ

Yem katkı maddesi olarak antibiyotiklerin yasaklanmasından dolayı insan sağlığına zarar vermeyen, patojenlerden kaynaklanan birçok problemi önleyerek, performansı iyileştirip karlılığı artıran doğal ve aromatik bitkilerden elde edilen esansiyel yağların hayvan beslenmede alternatif yem katkı maddesi olarak kullanımı yoğunluk kazanmıştır (1). Hayvansal üretimde bu doğal maddelerin kullanılmalarının amacı; yemden yararlanmayı artırmak, hayvansal ürünlerin miktar ve kalitesini yükseltmek, raf ömrünün uzatmak, hayvanların ve insanların sağlıklarını korumak ve elde edilen ürünlerin maliyetlerini düşürmektir (2).

Antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerinden dolayı narenciye kabuk yağlarının yem katkı maddesi olarak kullanımı son zamanlarda oldukça önem kazanmıştır. Esans yağ ve flavonoidler portakal (*Citrus sinensis*), limon (*Citrus limon*) ve bergamot (*Citrus bergamia*) gibi turuncgillerin kabuk kısmında yoğun bir şekilde bulunmaktadır. Bu kısımlar limonen ve linalool gibi uçucu yağları oldukça yüksek miktarda içermektedir (3). Portakal kabuk yağının en önemli bileşeni olan limonenin antioksidan aktivitesinin oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (4).

Yapılan çalışmalarda portakal kabuk yağının Japon bildircinlarının kalp ve karaciğer dokusunda MDA düzeyini önemli derecede düşürdüğü (5), ratlarda ise lipid peroksidasyonu önemli derecede azalttığı bildirilmiştir (6).

Ayrıca broylerler üzerinde yapılan bir çalışmada japon yuzu limonu (*Citrus junos*) ilavesinin but ve göğüs dokularında TBARS değerlerini önemli düzeyde azalttığı rapor edilmiştir (7).

Bu çalışma etlik piliç yemlerine değişik seviyelerde (1, 2 ve 3 ml/kg) narenciye esans yağları (bergamot, portakal, limon) ilavesinin but ve göğüs dokularında raf ömrü ve yağ asidi kompozisyonu üzerine etkilerini tespit etmek amacı ile yürütülmüştür.

MATERYAL ve METOT

Denemede bir günlük yaşta 500 adet (Ross 308) karışık cinsiyette etlik civciv kullanılmıştır. Denemede 10 grup oluşturulmuş, her grup beş alt gruba ayrılmıştır (5 adet erkek, 5 adet dişi). Birinci grup kontrol olup bazal yemle (Tablo 1), diğer gruplar ise bazal yeme sırası ile 1 mL, 2 mL ve 3 mL/kg düzeyinde bergomat kabuk yağı, limon kabuk yağı ve portakal kabuk yağı ilave edilerek oluşturulan rasyonlarla 6 hafta süreyle ad-libitum olarak beslenmişlerdir. Denemede etlik civciv başlangıç 1.dönem (0-14. günler arası), etlik civciv 2.dönem (15-21.günler), etlik piliç 3.dönem (22-35.günler) ve etlik piliç bitirme (36-42. günler) olmak üzere 4 farklı yem kullanılmıştır. Çalışma etik kurul ilkelerine uygun olarak yürütülmüştür. Rasyona ilave edilen narenciye kabuk yağları ticari bir firmadan temin edilmiştir.

Narenciye kabuk yağlarının etken madde düzeyleri GC-MS (Gas Chromatography ve Mass Spectrometry) ile tespit edilmiştir (portakal kabuk yağı: %97.46 limonene, %1.98 beta-myrecene, %0.22 linalool; Bergamot kabuk yağı: %35.66 DI-limonene, %20.28 linalool, %20.89 linalyl acetate, %2.13 beta-terpinlyl acetate, %14.96 alpha terpinenlyl acetate; Limon kabuk yağı: %1.92 beta-myrecene, %95.28 limonene, %1.32 E-citral, %0.94 Z-citral içeriyor). Deneme sonunda bütün hayvanlar kesilmiş, kesilen hayvanların but ve göğüs kısımlarından beş adet örnek alınarak + 4°C de depolanmış, 1 ve 3 günlerde TBARS (tiyobarbuturik asit reaktif madde) değerlerine bakılmıştır (8). Ayrıca but ve göğüs kısmından alınan örneklerde yağ asit kompozisyonu incelenmiştir (9).

İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin varyans analizi Genel Linear Model prosedürü ile ve önemli bulunan verilerin önem kontrolleri SPSS 10.01 (10) paket programı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir.

Tablo 1. Denemede kullanılan bazal yemin içeriği ve besin madde kompozisyonu.
Table 1. Ingredient of basal feed and nutrient composition of experimental diet.

Ham maddeler (g/kg)	Etlik civciv başlangıç yemi (0-14 gün)	Etlik civciv 2. dönem yemi (15-21)	Etlik piliç 3. dönem yemi (22-35)	Etlik Piliç Bitiş Yemi (36-42)
Mısır	575.50	575.50	600.02	635.02
Soya fasülyesi küspesi(HP %48)	175.50	110.00	67.18	28.72
Tam yağlı soya (HP %38)	160.00	219.50	240.00	240.00
Tavuk unu (HP% 60)	35.00	35.00	35.00	35.00
Et-kemik unu (HP %35)	34.00	34.00	34.00	34.00
Bitkisel yağ	4.00	10.00	13.63	17.18
Tuz	1.80	1.70	2.00	2.00
Lisin	3.00	2.23	1.99	1.80
Metiyonin	2.00	1.37	1.22	1.02
Mermer tozu	2.00	2.70	-	-
Vitamin karması ¹	2.00	2.00	2.00	2.00
Mineral karması ²	1.50	1.50	1.50	1.50
Soda	1.50	1.50	1.46	1.76
DCP	2.20	2.50	-	-
Toplam	1000	1000	1000	1000
Hesaplanan				
Ham protein (%)	23.00	21.80	20.05	19.40
Ham yağ (%)	8.03	9.79	10.50	11.00
Ham selüloz (%)	4.22	4.41	4.43	4.45
Ham kül (%)	5.59	5.25	5.13	4.98
ME(kcal/kg)	3040	3200	3180	3241
Ca (%)	1.05	0.99	0.98	0.95
P (%)	0.56	0.53	0.53	0.51
Metiyonin	1.22	0.98	0.90	1.00
Lisin	1.50	1.30	1.20	1.10
Analiz edilen				
Ham protein (%)	22.70	21.10	20.89	19.11
Ham yağ (%)	8.13	10.10	10.20	11.91
Ham selüloz (%)	3.96	4.20	4.22	4.23
Ham kül (%)	5.24	5.00	5.57	4.61

¹ Diyetin her kilogramında: 12 000 IU vitamin A, 3500 IU vitamin D3, 100 IU vitamin E, 3 mg vitamin K3, 2.5 mg vitamin B1, 6 mg vitamin B2, 25 mg niasin, 10 mg kalsiyum D-pantotenat, 4 mg vitamin B6, 0.015 mg vitamin B12, 1.5 mg folik asit, 0.150 mg D-biotin, 100 mg vitamin C, 0.450 mg kolin klorid. ² Diyetin her kilogramında: 100 mg Mangan, 25 mg demir, 65 mg çinko, 15 mg bakır, 0.25 mg kobalt, 1 mg iyot, 0.2 mg Selenyum.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Etin raf ömrüne etki eden en önemli faktör içerdiği lipidlerin acılaşmasıdır. Gıda maddelerinde yapılan TBARS analizinin yağlarda oksidasyonu gösteren önemli bir kalite kriteri olduğu ve bu değerlerin 3 mg/kg'dan daha az olması gerektiği

bildirilmiştir (11). Depolamanın 1. ve 3. günlerinde göğüs ve but dokularında TBARS değeri bakımından gruplar arasındaki fark önemsiz olarak ($P > 0.05$) bulunmuştur (Tablo 2). Gruplar arasında dokulara ait malondialdehit (MDA) değerleri istatistiksel olarak önemsiz olsa da 1.günde bergamotun tüm seviyeleri

ile limonun 1 ml/kg seviyesinde MDA değerlerinin 3 mg/kg'ın altında olduğu belirlenmiştir. Benzer olarak 3.günde bergamotun 3ml/kg seviyesinde TBARS değerinin 3 mg/kg'dan az olduğu ve bergamotun bu seviyesinde antioksidan düzeyinin yüksek olduğu görülmektedir. Göğüs dokularında depolamanın 1.

günü bergamotun 1 ml/kg seviyesi, limonun her üç seviyesi ve portakalın 1 ve 3 ml/kg seviyelerinde, depolamanın 3.günüde ise limon ve portakalın 1 ml/kg seviyesinde MDA değerlerinin 3mg/kg'ın altında olduğu bulunmuştur.

Tablo 2. Narenciye kabuk yağlarının etlik piliç but ve göğüs dokusu TBARS (mg MDA/kg doku) değeri üzerine etkisi.

Table 2. Effect of dietary supplementation of citrus peel oils on TBARS (mg MDA/kg tissue) values in leg and breast muscles of broilers.

Gruplar	TBARS			
	But		Göğüs	
	1. Day	3.Day	1. Day	3.Day
Kontrol	3.29	7.78	3.86	4.94
Bergamot 1 ml/kg	2.06	4.22	2.36	4.68
Bergamot 2 ml/kg	3.00	6.12	3.10	3.93
Bergamot 3 ml/kg	2.15	2.77	2.10	3.25
Limon 1 ml/kg	2.32	6.23	2.92	2.83
Limon 2 ml/kg	3.44	4.97	2.46	5.44
Limon 3 ml/kg	3.61	5.19	2.22	3.12
Portakal 1 ml/kg	4.36	6.06	2.59	2.95
Portakal 2 ml/kg	3.73	5.62	3.39	5.53
Portakal 3 ml/kg	4.36	6.85	2.04	4.07
SH	0.25	0.41	0.92	1.52
P	ÖS	ÖS	ÖS	ÖS
Günler	ÖS			
Yem x Günler	ÖS			

SH: Ortalamalar arası farklılığın standart hatası. ÖS:önemsiz. MDA: Malondialdehyde.

Khan ve ark. (12) narenciye kabuk yağlarının yüksek oranda fenolik içeriğe sahip olduğunu ve bu fenolik içerik ile antioksidan aktivite arasında önemli bir korelasyon olduğunu tespit etmişlerdir. Çiftçi ve

ark. (5) tarafından yapılan bir çalışmada soğuk strese maruz bırakılan Japon bıldırcınlarının yemine portakal kabuğu ekstraktı ilavesinin karaciğer ve kalp dokusunda MDA düzeyinin önemli derecede düştüğü

tespit edilmiştir. Rat yemlerine portakal kabuğu yağı ilavesinin lipit peroksidasyonu önemli derecede azalttığı ve oksidatif stres yönetiminde portakal kabuk yağının önemli bir potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir (6). Kan plazması lipit peroksidasyon değerinin azalmasında antioksidan olan portakal kabuk yağının muhtemel bir rolünün olduğu ve bunu içerdiği yüksek orandaki terpenik aldehitlerle sağladığı açıklanmıştır (13,14). Bu aldehitlerin esans yağların major bileşenleri olduğu ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (13). Portakal kabuk yağının majör bileşeninin antioksidan aktiviteye sahip limonen olduğu belirtilmiştir (4).

Ahmed ve ark. (7) broiler rasyonlarına 5, 10, 15 ve 20 g / kg yuzu (Citrus Junos) ilavesinin but ve göğüs dokularında TBARS değerlerini önemli düzeyde azalttığını ifade etmişlerdir.

Bu çalışmada bütün çalışma gruplarında göğüs ve but dokularında TBARS değerlerinin depolama süresine bağlı olarak artış gösterdiği ancak aradaki farkın istatistik olarak önemsiz ($P>0.05$) olduğu saptanmıştır.

Tablo 3 incelendiği zaman broyler rasyonlarına farklı seviyelerde narenciye kabuk yağları ilavesinin göğüs dokularında yağ asidi kompozisyonunu önemli derecede değiştirdiği gözlenmiştir. Palmitik asit (16:0) ve stearik asit (20:0) dışındaki doymuş yağ asitlerinin narenciye kabuk yağı ilavesinden etkilenmediği belirlenmiştir. Rasyona 2 ve 3ml/kg düzeyinde bergamot kabuk yağı ilavesinin toplam doymuş yağ asitleri (SFA) düzeyini önemli derecede artırdığı tespit edilmişken, 1 ve 2 ml/kg limon kabuğu yağı ilavesinin SFA oranını düşürdüğü bulunmuştur.

Bergamotun 1 ve 2 ml/kg seviyesi palmitik asit (16:0) oranını, 3 ml/kg seviyesi ise stearik asit seviyesini kontrol grubuna göre önemli derecede artırmıştır. Çiftçi ve ark. (5) yapmış oldukları çalışmada Japon bıldırcın rasyonlarına 200 ppm düzeyinde portakal kabuğu ekstraktı ilavesinin stearik asit oranını önemli düzeyde azalttığını fakat toplam SFA miktarı üzerine etki etmediğini açıklamışlardır.

Tablo 3. Narenciye kabuk yağlarının etlik piliç göğüs dokusu yağ asidi kompozisyonu üzerine etkisi.**Table 3.** Effect of dietary supplementation of citrus peel oils on fatty acid composition in breast muscles of broilers.

Yağ asitleri	Kontrol	Portakal 1ml/kg	Portakal 2ml/kg	Portakal 3ml/kg	Limon 1ml/kg	Limon 2ml/kg	Limon 3ml/kg	Bergamot 1ml/kg	Bergamot 2ml/kg	Bergamot 3ml/kg	SH	P
Yağ oranı	1.62bc	1.79b	1.80ab	2.01ab	2.13a	1.89ab	1.65bc	1.83ab	1.56c	1.21c	0.06	**
Laurik	0.31	0.24	0.36	0.34	0.28	0.32	0.32	0.31	0.34	0.46	0.01	ÖS
Miristik	0.26	0.48	0.38	0.25	0.25	0.29	0.23	0.27	0.26	0.26	0.02	ÖS
Palmitik	15.68ab	15.77ab	14.81bc	15.42ab	15.41ab	14.54c	14.76bc	16.26a	16.18a	15.29b	0.12	**
Palmitoleik	2.27	1.72	2.00	1.90	1.75	2.02	1.52	2.09	1.86	1.67	0.06	ÖS
Stearik	8.09b	7.69bc	7.49bc	7.65bc	7.37c	7.49bc	8.21ab	7.45bc	8.65ab	9.24a	0.14	*
Oleik	30.16	29.57	29.07	28.90	29.69	29.66	29.20	29.77	28.12	27.24	0.21	ÖS
Linoleik	33.06bc	34.07b	33.54ab	35.18ab	35.72a	34.44ab	33.56bc	33.43bc	32.77bc	31.52c	0.27	**
Linolenik	2.14	2.20	2.35	2.34	2.34	2.33	2.33	2.23	1.91	2.05	0.05	ÖS
Araşidick	0.29	0.30	0.34	0.28	0.29	0.33	0.29	0.35	0.29	0.31	0.01	ÖS
Eichosenoik	0.47c	0.50bc	0.49bc	0.51b	0.46c	0.46c	0.50bc	0.48c	0.65a	0.63ab	0.03	*
Eikosadienoik	3.35bc	3.16bc	3.34bc	3.07bc	2.74c	3.19bc	3.83b	3.32bc	4.29ab	5.25a	0.16	**
Araşidonik	0.08bc	0.08bc	0.30a	0.06c	0.10bc	0.16b	0.10bc	0.14bc	0.12bc	0.23ab	0.02	*
Dokosadienoik	0.87bc	0.80bc	0.99b	0.70bc	0.67c	0.86bc	0.88bc	0.79bc	0.94bc	1.35a	0.04	**
EPA (20:5n3)	0.03b	0.03b	0.16a	0.04b	0.04b	0.07b	0.03b	0.08b	0.03b	0.04b	0.01	*
DHA (22:6n3)	0.40	0.46	0.79	0.43	0.36	0.53	0.53	0.48	0.63	0.74	0.04	ÖS
SFA	24.63bc	24.49bc	23.39c	23.94bc	23.59c	22.97c	23.79b	24.64ab	25.71a	25.56a	0.21	*
MUFA	32.89a	31.78ab	31.56ab	31.32b	31.91ab	32.14bc	31.22bc	32.33ab	30.63bc	29.53c	0.23	*
PUFA	39.92	40.80	41.48	41.83	41.97	41.57	41.25	40.47	40.69	41.18	0.16	ÖS
n3 (omega3)	2.57b	2.69b	3.31a	2.81b	2.74b	2.93b	2.89b	2.79b	2.57b	2.83b	0.05	*
n6 (omega6)	33.14bc	34.15bc	33.85a	35.24ab	35.83a	34.59b	33.66bc	33.56bc	32.89bc	31.75c	0.26	**
n6/n3	12.95ab	12.71ab	10.31c	12.54b	13.09a	11.84bc	11.73bc	12.01bc	12.85ab	11.27bc	0.12	*

a-b Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasında fark önemli bulunmuştur P < 0.01 (**), P < 0.05 (*) ÖD; önem durumu; ÖS önemsiz; EPA: Ekosapentaenoik asit. DHA: Dokosaheksaenoik asit. SFA: Doymuş yağ asitleri. MUFA: Tekli doymamış yağ asitleri. PUFA: Çoklu doymamış yağ asitleri

Araştırmamızda broyler yemlerine 3 ml/kg düzeyinde bergamot kabuk yağı ilavesinin toplam tekli doymamış yağ asitleri (MUFA) oranını önemli derecede ($P<0.05$) düşürdüğü saptanmıştır. En yüksek eikosenoik asit oranı (20:1) 2 ml/kg bergamot kabuk yağı tüketen grupta görülmüş olup, narenciye kabuk yağlarının palmitoleik asit (16:1) ve oleik asit (18:1) oranına etki etmediği belirlenmiştir (Tablo 2).

Rasyona narenciye kabuk yağı ilavesinin toplam doymamış yağ asitleri (PUFA), linolenik asit (18:3) ve docosohexaenoik (DHA) oranını etkilemediği görülmüştür. En yüksek linoleik asit (18:2) oranı bazal yeme 1 ml/kg limon kabuk yağı ilave edilen grupta görülmüşken, en düşük linoleik asit oranı 3 ml/kg bergamot kabuk yağı ilave edilen grupta tespit edilmiştir. Linoleik asidin aksine en yüksek eikosadienoik asit (C20:2) ve dokosadienoik asit (22:2) oranları 3 ml/kg bergamot kabuk yağı ilave edilen gruplarda bulunmuştur. Broiler yemlerine 2 ml/kg portakal kabuk yağı ilavesinin araşidonik asit, DHA (22:6n3), toplam omega 3 ($\Sigma \omega-3$) ve omega 6 oranlarını önemli derecede artırdığı gözlenmiştir (Table 3). Çiftçi ve ark. (5) tarafından yapılan çalışmada portakal kabuk ekstraktı ile beslenen Japon bildircinlerinin göğüs dokularında omega-3, eikosadienoik asit ve DHA oranının önemli derecede arttığı bildirilmiştir. Bu araştırma sonuçları ile benzer olarak Bölükbaşı ve ark. (15) yumurtacı tavuk rasyonlarına bergamot yağı ilavesinin yumurta sarısı eikosapentaenoik aside (EPA), DHA ve omega-3 yağ asit oranını önemli derecede artırdığını ve omega-6/omega-3 oranını ise azalttığını tespit etmişlerdir. Bölükbaşı ve ark. (16) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise yumurta tavuğu rasyonlarına 1 ve 1.5 ml/kg bergamot yağı ilavesinin yumurta sarısı DHA oranını artırdığı, omega-6/omega-3 oranını azalttığı bildirilmiştir.

Bu çalışmada rasyona narenciye kabuk yağı ilavesinin but dokularında toplam yağ oranı ile doymuş yağ asidi oranını önemli derecede etkilediği bulunmuştur (Tablo 3). Rasyona 2 ml/kg limon kabuk yağı ilavesinin but etlerinde SFA, miristik asit (14:0) ve palmitik asit (16:0) oranlarını önemli derecede düşürdüğü tespit edilmiştir. Arşidik asit (20:0) oranı muamelelerden etkilenmezken, laurik asit (12:0) oranı 1 ml/kg portakal kabuk yağı ilave edilen grupta stearik asit (18:0) oranı ise 2 ml/kg bergamot kabuk yağı ilave edilen grupta en düşük seviyeye ulaşmıştır.

Trigliseritlerin karaciğerde hepatik lipogenez ile üretildiği (17, 18) ve bazı bitkisel katkıların lipogenezini azalttığı ileri sürülmüştür. Bizde but dokularında SFA oranının azalmasını bu durum ile açıklayabiliriz.

Araştırmamızda palmitik yağ asit oranının 2 ml/kg limon kabuk yağı ilavesiyle önemli derecede düştüğü saptanmıştır. Palmitik asit LDL kolesterolün artmasından sorumlu olan ve kardiovasküler hastalıklara neden olan bir yağ asididir. Bu gibi nedenlerden dolayı palmitik asidin dokularda daha düşük seviyeye inmesi sağlık açısından olumlu bir gelişme olarak görülmüştür.

Araştırma sonunda narenciye kabuk yağlarının but dokularında tekli doymamış yağ asitlerini (MUFA) önemli oranda değiştirdiği tespit edilmiştir. Toplam MUFA ve oleik asit (18:1) oranının 3 ml/kg portakal kabuk yağı ilavesiyle önemli derecede azaldığı, 1 ml/kg limon kabuk yağı ilavesinin ise palmitoleik asit (16:1) oranını azaltırken eikosenoik (20:1) asit oranını artırdığı görülmüştür.

Yemlere narenciye kabuk yağı ilavesinin toplam PUFA, araşidonik asit (20:4), dokosadienoik asit (22:2), omega-3 ve omega-6/omega-3 yağ asidi kompozisyonuna önemli bir etkisi olmadığı görülmüştür. But dokularında EPA (20:5n3) ve DHA (22:6n3) oranı 3 ml/kg portakal yağı ilave edilen gruplarda çok önemli derecede ($P<0.01$) yükselmiştir. Limon kabuk yağının 1 ml seviyesinin ise linoleik asit (C18:2) ve linolenik asit (18:3) oranlarını artırırken eikosadienoik asit (20:2) oranını düşürdüğü tespit edilmiştir.

Omega 6 oranı 1 ml/kg limon ve 2 ml/kg portakal ve bergamot yağı ilavesiyle en yüksek değere ulaşmıştır. $\Delta-6$ desaturaz enziminin linoleik asidin araşidonik aside ve α -linolenik asidin docosohexaenoik (DHA) ve eikosapentaenoik aside (EPA) dönüşümünü teşvik ettiği bildirilmiştir (19). Bu çalışmada da 3 ml/kg portakal kabuk yağı seviyesinin bu dönüşümü teşvik etmiş olabileceği düşünülmektedir.

Carrillo-Dominguez ve ark. (20) çalışmalarında dokularda omega 3 ve DHA'nın yükselmesinin sebebini yumurtacı tavukların karaciğerinde α -linoleik asidin elengasyon ve desaturasyonu ile açıklamıştır.

Tablo 4. Narenciye kabuk yağlarının etlik piliç but dokusu yağ asidi kompozisyonu üzerine etkisi**Table 4.** Effect of dietary supplementation of citrus peel oils on fatty acid composition in leg muscles of broilers.

Yağ asitleri	Kontrol	Portakal 1ml/kg	Portakal 2ml/kg	Portakal 3ml/kg	Limon 1ml/kg	Limon 2ml/kg	Limon 3ml/kg	Bergamot 1ml/kg	Bergamot 2ml/kg	Bergamot 3ml/kg	SH	P
Yağ oranı	3.04b	4.09ab	3.92ab	3.09b	4.73a	3.82ab	3.94ab	3.42ab	4.82a	3.62ab	3.55	*
Laurik	0.19a	0.09c	0.16b	0.21a	0.11bc	0.17ab	0.15bc	0.16b	0.11bc	0.14bc	0.14	**
Miristik	0.28ab	0.26b	0.28ab	0.29a	0.27ab	0.25bc	0.26b	0.27ab	0.25bc	0.26b	0.01	**
Palmitik	15.96a	15.15ab	15.18ab	14.49ab	14.72bc	14.27c	14.63bc	15.64ab	14.63bc	15.0b	0.02	**
Palmitoleik	2.15ab	2.10b	1.95bc	1.85bc	1.82c	1.99bc	2.00bc	2.42a	2.14ab	1.95bc	0.11	**
Stearik	7.10a	6.72ab	6.46ab	7.16a	6.65ab	6.01b	6.54ab	6.79ab	5.77c	6.5ab	0.03	*
Oleik	29.99a	30.36a	29.42ab	28.31b	29.64a	30.75a	30.77a	30.37a	30.75a	30.2 a	0.10	**
Linoleik	35.32b	37.22ab	37.83a	36.67ab	37.68a	37.45a	37.05ab	35.78b	37.92a	37.3ab	0.17	*
Linolenik	2.49b	2.69b	2.61b	2.67b	3.07a	2.71b	2.58b	2.51b	2.83ab	2.65b	0.20	**
Araşidik	0.29	0.29	0.29	0.32	0.28	0.29	0.29	0.30	0.30	0.31	0.03	ÖS
Eichosenoik	0.38b	0.35b	0.36b	0.49a	0.37b	0.37b	0.33b	0.36b	0.36b	0.37b	0.01	*
Eikosadienoik	2.34ab	1.82bc	2.01b	2.76a	1.56c	1.83bc	1.95bc	2.26ab	1.50c	2.00b	0.01	**
Araşidonik	0.08	0.05	0.07	0.08	0.06	0.05	0.06	0.07	0.06	0.07	0.08	ÖS
Dokosadienoik	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.03	0.04	0.04	0.03	0.01	ÖS
EPA	0.56ab	0.40cb	0.52ab	0.62a	0.33c	0.46b	0.39cb	0.49ab	0.34c	0.44cb	0.01	**
DHA	0.33b	0.24b	0.28b	0.47a	0.22b	0.26b	0.28b	0.34b	0.21b	0.26b	0.02	**
SFA	23.81a	22.51b	22.36ab	22.47bc	22.03bc	20.99c	21.87bc	23.17bc	21.06c	22.3bc	0.01	**
MUFA	32.51ab	32.80ab	31.7 ab	30.65b	31.83ab	33.12ab	33.09ab	33.15a	33.24a	32.5ab	0.19	**
PUFA	41.15	42.45	43.36	43.25	42.94	42.79	42.33	41.48	42.89	42.79	0.18	ÖS
n3	2.85	2.96	2.93	3.16	3.32	3.00	2.89	2.88	3.07	2.94	0.03	ÖS
n6	35.40c	37.27ab	37.90a	36.75b	37.74a	37.49ab	37.10ab	35.85bc	37.98a	37.4ab	0.20	*
n6/n3	12.40	12.58	12.94	11.68	11.47	12.52	12.82	12.45	12.36	12.74	0.13	ÖS

a-b Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasında fark önemli bulunmuştur P < 0.01 (**) ve P < 0.05 (*) ÖD; önem durumu; ÖS önemsiz; EPA: Ekosapentaenoik asit. DHA: Dokosaheksaenoik asit. SFA: Doymuş yağ asitleri. MUFA: Tekli doymamış yağ asitleri. PUFA: Çoklu doymamış yağ asitleri

DHA'nın beyin ve retinal gelişim üzerine önemli etkileri olduğu bilinmektedir (21). Ancak insanların EPA ve DHA gibi uzun zincirli omega 3 yağ asitlerini alfa linolenik asitten sentezleme kapasiteleri sınırlıdır. Bu yüzden alternatif bir yem katkı maddesi olabilecek narenciye kabuk yağları ile yemlenen hayvanların ürünleri insan sağlığı üzerinde olumlu gelişmelere neden olabilir.

Sonuç olarak narenciye kabuk yağlarının istatistiksel olmasa da göğüs etlerinde özellikle limon ve portakal kabuk yağlarının TBARS değerlerini 3 mg/kg değerinin altına düşürdüğü ve bu değerlerin gıda kalite kriterlerine uygun olduğu belirlenmiştir. Ayrıca portakal kabuk yağının 2 ml seviyesinin göğüs dokularında, 3 ml seviyesinin ise but dokularında EPA ve DHA oranını önemli derecede artırdığı, limon kabuk yağının ise 2 ml seviyesinin hem göğüs hem de but dokularında SFA oranını düşürdüğü tespit edilmiştir. Bu nedenlerden dolayı portakal kabuk yağının 3 ml/kg düzeyinde yemlerde kullanılmasının yararlı olacağı sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Gemici İ.. 2006. Origanum Vulgare SSP.Hirtum bitki ekstraktının broyler piliçlerinin performansına etkileri. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi. Fenbilimleri Enstitüsü. Türkiye.
- Mazmaloğlu G.. 2008. Etlik piliç yemlerine antibiyotik, esansiyel yağ ve organik asit katılmasının performans, organ ağırlıkları ev kan parametreleri üzerine etkileri. İstanbul Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. İstanbul.
- Min-Hsiung P.. 2009. Chemopreventive effects of natural dietary compounds on cancer development. Second Symposium on France-Taiwan Frontiers of Science Tentative Program.
- Roberto D., Micucci P., Sebastian T., Graciela F., Anesini C.. 2010. Antioxidant activity of limonene on normal murinelymphocytes: relation to H2O2 modulation and cell proliferation. Basic Clin Pharmacol. Toxicol. 106. 38-44.
- Çiftçi M., Şimşek ÜG., Dalkılıç B., Azman MA., Yılmaz Ö., İflazoğlu Mutlu S., Özçelik M., Baykalır., Tonbak F., Bahşi B.. 2016. Effect of dietary orange peel extract on physiological, biochemical, and metabolic responses of Japanese quail reared under low ambient temperature. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 40. 288-297.
- Ochuko L., Erukainure, John A., Davis F., Obabire K., Aliyu M.. 2012. Effect of orange (citrus sinensis) peel oil on lipid peroxidation, catalase activity and hepatic biomarker levels in blood plasma of normo rats. J Biomed. Pharmaceutical Res. 1. 16-23.
- Ahmed ST., Muna H., Sislama MM., Kima SS., Hwanga JA., Kima YJ., Yanga CJ.. 2014. Effects of Citrus junos by-products fermented with multistrain probiotics on growth performance, immunity, caecal microbiology and meat oxidative stability in broilers. Br. Poult. Sci. 55. 540-547.
- Lemon DW.. 1975. An ilmpoved TBA test for rancidity new series circular. Halifax. Nova Scotia. No. 51. 1-4.
- Anonymous. 2000. Sherlock microbial identification system. version 4 MIS Operating Manuel. Newark, DE. USA.
- SPSS. 1996. SPSS for Windows Release 10.0. SPSS Inc. Chicago.
- Cadun A., Caklı S., Kışla DA.. 2005. Study of marination of deepwater pink shrimp (Parapenaeus longirostris, Lucas, 1846) and its shelf life. Food Chem. 90. 53-59.
- Khan MM., Iqbal M., Hanif MA., Mahmood MS., Naqvi SA., Shahid M., Muhammad Jaskani J.. 2012. Antioxidant and antipathogenic activities of citrus peel oils. J Essent. Oil Bear.Pl. 15. 972-979.
- Lado C., Then M., Varga I., Szokeb E., Szentmihalyid K.. 2004. Antioxidant property of volatile oils determined by the ferric reducing ability. Z Naturforsch. 59. 354-358.
- Chikhi I., Allali H., Dib HE., Halla H., Muselli A., Tabti B., Costa J.. 2012. Free radical scavenging and antibacterial activity of essential oil and solvent extracts of Iris planifolia (Mill) from

- Algeria. J Med. Plants Res. 6. 1961-1968.
15. Bölükbaşı ŞC., Erhan MK., Ürüsan H., 2010. The effect of supplementation of bergamot oil (Citrus bergamia) on egg production, egg quality, fatty acid composition of egg yolk in laying hens. J.Poult. Sci. 47. 163-169.
 16. Bölükbaşı SC., Ürüsan H., Erhan MK., Kızıltunç A., 2010. Effect of dietary supplementation with bergamot oil (Citrus bergamia) on performance and serum metabolic profile of hens, egg quality and yolk fatty acid composition during the late laying period. Arch. Geflügelk. 74. 172-177.
 17. Lanza-Jacoby S., 1986. Effect of continuous and discontinuous intravenous or intragastric total parenteral nutrition in rats on serum lipids, liver lipids and liver lipogenic rates. J Nutr. 116. 733-741.
 18. Herzberg GR., Rogerson M., 1988. Hepatic fatty acid synthesis and triglyceride secretion in rats fed fructose- or glucose-based diets containing corn oil, tallow or marine oil. J Nutr. 118. 1061-1067.
 19. Pereira ALF., Vidal TF., Abreu VKG., Zapata JFF., Freitas ER., 2011. Type of dietary lipids and storing time on egg stability. Food Sci. Thec. 31. 984-991.
 20. Carrillo-Dominguez S., Carranco-Jauregui ME., Castillo-Dominguez RM., Castro-Gonzalez MI., Avila Gonzalez E., Perez-Gil F., 2005. Cholesterol and n-3 and n-6 fatty acid content in eggs from laying hens fed with red crab meal (Pleuroncodes planipes). Poult. Sci. 84. 167-172.
 21. Simopoulos AP., 2000. Role of poultry products in enriching the human diet with n-3 PUFA. Human requirement for n-3 polyunsaturated fatty acids. Poult. Sci. 79. 961-970.



Ratlarda Methotrexate Kaynaklı Karaciğer Toksisitesine Karşı Silymarin ve Naringin'in Yararlı Etkileri*

Fatih Mehmet KANDEMİR¹, Sefa KÜÇÜKLER¹, Cüneyt ÇAĞLAYAN²✉

1. Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Ana Bilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
2. Bingöl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Bingöl, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
22.12.2016	08.03.2017	30.10.2017

Öz: Karaciğer toksisitesi, kemoterapötik bir ilaç olan methotrexate (MTX) terapisinin komplikasyonlarının sonucunda oluşur. Silymarin (SLY) ve naringin (NRG) antioksidant, anti-inflamatuvar ve anti-hiperlipidemik gibi birçok farmakolojik özelliklere sahip biyoflavonoidlerdir. Bu çalışma ratlarda MTX kaynaklı karaciğer toksisitesi üzerine SLY ve NRG'in yararlı etkilerinin araştırılması için yapılmıştır. Ratlara (20 mg/kg) tek doz periton içi MTX verildikten sonra 7 gün boyunca (25 ve 50 mg/kg) SLY ve (50 ve 100 mg/kg) NRG tedavisi oral yoldan gavaj ile verilmiştir. MTX; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzim aktivitelerini ve glutatyon (GSH) seviyesini azaltıp, lipid peroksidasyonunu artırarak oksidatif hasarı tetiklediği belirlenmiştir. Üstelik MTX toksikasyonu aspartat amino transferaz (AST), alanin amino transferaz (ALT) ve alkalın fosfataz (ALP) gibi karaciğer enzim aktivitelerini artırmıştır. Diğer taraftan SLY ve NRG tedavisi GSH seviyesini ve antioksidan enzim aktivitelerini artırıp, lipid peroksidasyonunu inhibe etmiştir. Ayrıca SLY ve NRG tedavisi, MTX grubu ile karşılaştırıldığında karaciğer enzim aktivitelerini azalttığı belirlenmiştir. Bu çalışmada SLY ve NRG, MTX'in neden olduğu karaciğer toksisitesine karşı yararlı etki sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer enzimleri, Methotrexate, Naringin, Oksidatif stress, Silymarin.

Beneficial Effects of Silymarin and Naringin Against Methotrexate-induced Hepatotoxicity in Rats

Abstract: Hepatotoxicity occurs as a result of the complications of methotrexate (MTX) therapy, which is a chemotherapeutic drug. Silymarin (SLY) and naringin (NRG) are bioflavonoids possess multiple pharmacological properties such as antioxidant, anti-inflammatory and anti-hyperlipidemic activity. This study was undertaken to investigate the beneficial effects of SLY and NRG on MTX-induced liver toxicity in rats. After a single dose of intraperitoneal MTX (20 mg/kg) was given to rats, SLY (25 and 50 mg/kg) and NRG (50 and 100 mg/kg) treatment was given by oral gavage for 7 days. It has been determined that MTX induces oxidative stress by increasing lipid peroxidation, decreased in glutathione (GSH) level and antioxidant enzyme activities such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). Moreover, MTX toxication has increased liver enzyme activities such as aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP). On the other hand, SLY and NRG treatment increased the level of glutathione (GSH) and antioxidant enzyme activities and inhibited lipid peroxidation. It has also been determined that SLY and NRG treatment reduces liver enzyme activities when compared to the MTX group. In this study, SLY and NRG provided a beneficial effect against MTX-induced liver toxicity.

Keywords: Liver enzymes, Methotrexate, Naringin, Oxidative stress, Silymarin.

✉ Cüneyt ÇAĞLAYAN

Bingöl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Bingöl, TÜRKİYE.
e-posta: ccaglayan@bingol.edu.tr

*Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel araştırma projesinin fonuyla desteklenmiştir. (Proje numarası: BAP 2015/52)

GİRİŞ

Folik asit antagonisti olarak bilinen Methotrexate (MTX), dihidrofolat redüktazı (DHFR) inhibe ederek nükleik asit sentezine doğrudan müdahale edebilen kemoterapötik bir ilaçtır. Methotrexate, farklı kanser tipleri, sedef hastalığı ve otoimmün bozuklukların tedavisinde sıklıkla kullanılır (1). Methotrexate'ın klinik kullanımını sınırlayan en önemli yan etkilerinden biri karaciğer toksisitesine neden olmasıdır (2). Karaciğer, ilaçların hem biyolojik dönüşümü hem de ilaçların neden olduğu zararların azaltılması için merkezi bir rol oynamasına rağmen, bu ajanlar tarafından indüklenen toksisiteye karşı oldukça yatkındır (3). Methotrexate kaynaklı hepatotoksitenin esas mekanizması henüz bilinmemesine rağmen, başta oksidatif stres olmak üzere birkaç hipotez öne sürülmüştür (4,5). Methotrexate'ın karaciğerdeki toksik etkilerinin altında yatan temel sebep, serbest radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin üretilmesiyle artan oksidatif strese bağlı olduğu hipotezi daha ağır basmaktadır (6). Bunun için birçok çalışmada, doğal bitkisel ürünlerin ham ve saflaştırılmış formları kullanılarak anti-kanser ilaçların neden olduğu yan etkileri azaltılması için çalışmalar sürdürülmektedir (7,8).

Fenolik yapıları antioksidanların, hücre bileşenlerini oksidatif hasara karşı koruyarak oksidatif strese bağlı çeşitli hastalıkların riskini sınırlandırdığı bildirilmiştir (9). Silymarin (SLY), bitki kökenli bir flavonoid olup, Süt dikeninin (Silymarin Marianum) tohum ve meyvelerinden izole edilir (10). Radyasyon, alkol bağımlılığı, iskemi, çevresel toksinler ve CCl₄ gibi kimyasal ajanlar ile indüklenen karaciğer hasarına karşı koruma sağladığı rapor edilmiştir. Ayrıca antioksidan, anti-inflamator ve anti-apoptotik gibi farmakolojik etkilerinin olduğu bildirilmiştir (11).

Naringin (NRG) (4',5,7-trihydroxyflavanone 7-rhamnoglucoside) üzüm meyvesi ve birçok narenciye meyvesinin majör ve aktif bir flavanon glikozitidir. Naringin oral yoldan verildiğinde, α -ramnosidaz ve β -glukozidaz gibi enzimler tarafından hidroliz edilerek emilebilir formu olan naringenin bileşiğine dönüşür

(12). Naringin'in anti-ülser, antioksidan anti-inflamator, anti-apoptotik ve anti-hiperlipidemik etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (13). Bu çalışma, ratlarda methotrexate'ın neden olduğu karaciğer hasarına karşı silymarin ve naringin'in etkilerinin araştırılması için yapıldı.

MATERYAL ve METOT

Deneysel Protokol

Methotrexate (50 mg flakon®) Koçak farma şirketinden satın alındı (İstanbul, Türkiye). Silymarin (katalog no: S0292), naringin (katalog no: 10236-47-2) ve diğer kimyasallar analitik saflıkta olup, Sigma-Aldrich kimyasal şirketinden satın (St. Louis MO, ABD) alındı. Methotrexate, silymarin ve naringin'in doz seçimleri önceki çalışmalar esas alınarak yapıldı (14-16).

Çalışmada Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinde (ATADEM) yetiştirilen 220-250 gram ağırlığındaki 56 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar uygulamadan bir hafta önce seçilerek yeni ortamlarına adaptasyonları sağlandı. Hayvanlar 24-25 °C sabit sıcaklık ve onikişer saatlik karanlık-aydınlık siklusu sağlanarak kontrollü bir odada, kafeslerde tutuldu. Deney süresince ratlara standart sıçan yemi ile su *ad libitum* verildi. Yapılan çalışmanın etik kurallara uygun olduğu Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığının izni ile onaylandı (Protokol No: 2015-2/52).

Sprague dawley ratlar rastgele her grupta 7 rat olacak şekilde 8 gruba ayrıldı.

1.Grup (Kontrol): Sadece periton içi serum fizyolojik uygulandı.

2.Grup (NRG 100): Hayvanlara oral yolla gavaj ile 100 mg/kg/gün dozunda NRG 7 gün süre ile verildi.

3.Grup (SLY 50): Hayvanlara oral yolla gavaj ile 50 mg/kg/gün dozunda SLY 7 gün süre ile verildi.

4.Grup (MTX): Karaciğer toksisitesi sağlamak üzere 20 mg/kg/gün periton içi tek doz olarak MTX verildi.

5.Grup (MTX + NRG 50): 20 mg/kg/gün, tek doz periton içi MTX uygulaması ile birlikte, 50 mg/kg/gün NRG oral yolla gavaj ile 7 gün süre ile verildi.

6.Grup (MTX + NRG 100): 20 mg/kg/gün, tek doz periton içi MTX uygulaması ile birlikte, 100 mg/kg/gün NRG oral yolla gavaj ile 7 gün süre ile verildi.

7.Grup (MTX + SLY 25): 20 mg/kg/gün, tek doz periton içi MTX uygulaması ile birlikte, 25 mg/kg/gün SLY oral yolla gavaj ile 7 gün süre ile verildi.

8.Grup (MTX + SLY 50): 20 mg/kg/gün, tek doz periton içi MTX uygulaması ile birlikte, 50 mg/kg/gün SLY oral yolla gavaj ile 7 gün süre ile verildi.

Çalışma süresinin bitiminde 24 saat sonra hayvanlar hafif sevofloran (Sevorane liquid 100%, Abbott Laboratuvar, İstanbul, Türkiye) anestezisi altında dekapite edilerek, kan ve doku örnekleri alındı. Kan örnekleri serum enzim analizleri için antikoagülsüz tüplere aktarıldı, +4 °C' de 1000xg'de, 10 dk. santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve biyokimyasal analizler yapılıncaya kadar -20°C' de (deep-freezde) saklandı. Hayvanlardan alınan karaciğer dokusu ise biyokimyasal tahliller için alınarak deneyler yapılıncaya kadar -20 °C' de muhafaza edildi.

Karaciğer Fonksiyon Analizi

Serum ALP, ALT, AST aktiviteleri ticari kitler (TML, Tanı Medikal Ürünler, Ankara, Türkiye) ile ELİSA reader (Bio-Tek, Winooski, VT, USA) cihazında ölçüldü.

Lipid Peroksidasyon ve Antioksidanların Analizi

Karaciğer doku homojenatındaki malondialdehit (MDA) seviyesi Placer ve ark. metoduna göre belirlendi (17). MDA seviyesi nmol/g

doku olarak belirtildi. Karaciğer katalaz (KAT) enzim aktivitesi için Aebi metodu kullanıldı (18) ve katal/g protein olarak ifade edildi. Protein konsantrasyonunun tayininde Lowry ve ark. metodu kullanıldı. (19). Karaciğer dokusundaki süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi Sun ve ark. metodu ile tayin edildi (20). Birimi U/g protein olarak belirtildi. Karaciğer dokusunun glutatyon (GSH) seviyesi Sedlak ve Lindsay (21) metoduna göre yapıldı. nmol/g karaciğer doku olarak ifade edildi. Karaciğer dokusundaki glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesi Lawrence ve Burk (22) metoduna göre ölçümü yapılmış olup, U/g protein olarak ifade edildi.

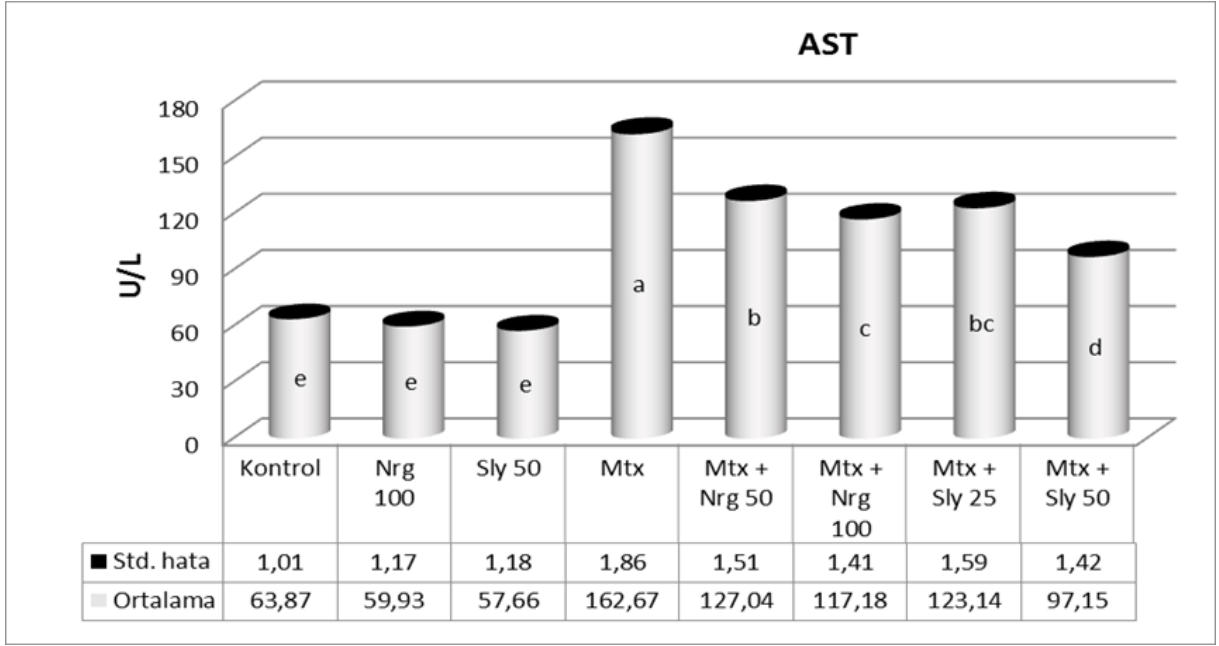
İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi için SPSS 12.0 paket programı kullanıldı. istatistiksel farklılıklar ve önem seviyeleri "One-way Analysis of Variance (ANOVA)" testi ile belirlenirken gruplar arası farkların tespitinde Tukey testinden yararlanıldı. P<0.05 seviyesindeki sonuçlar önemli kabul edilirken tüm değerler ortalama ± standart hata (± SEM) olarak verildi.

BULGULAR

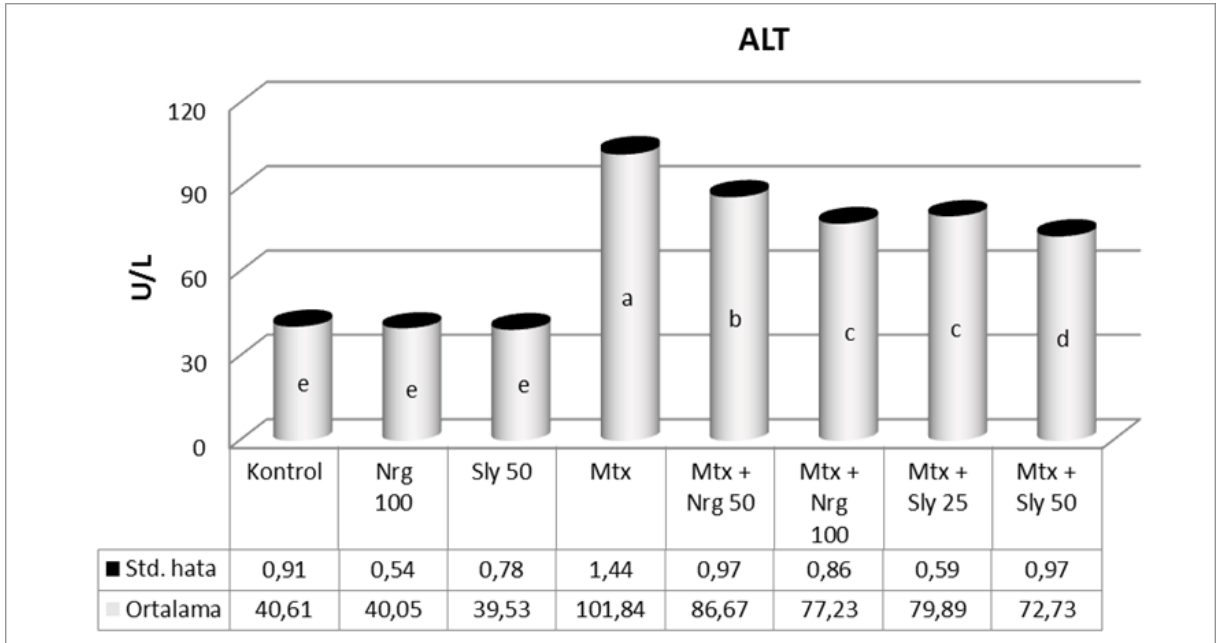
Karaciğer Fonksiyon Analizi

Karaciğer fonksiyon testleri olarak bilinen serum AST, ALT ve ALP enzim aktiviteleri şekil 1, 2 ve 3'te gösterilmiştir. Methotrexate uygulamasının serum AST, ALP ve ALT düzeylerini kontrol grubuna göre artırdığı (P<0.05) gözlemlenmiştir. Methotrexate ile birlikte tedavi amacıyla verilen silymarin (25 ve 50 mg/kg) ve naringin (50 ve 100 mg/kg) dozlarının serum AST, ALT ve ALP enzim aktivitelerini MTX ile indüklenen gruba göre belirgin şekilde azalttığı tespit edilmiştir (P<0.05)



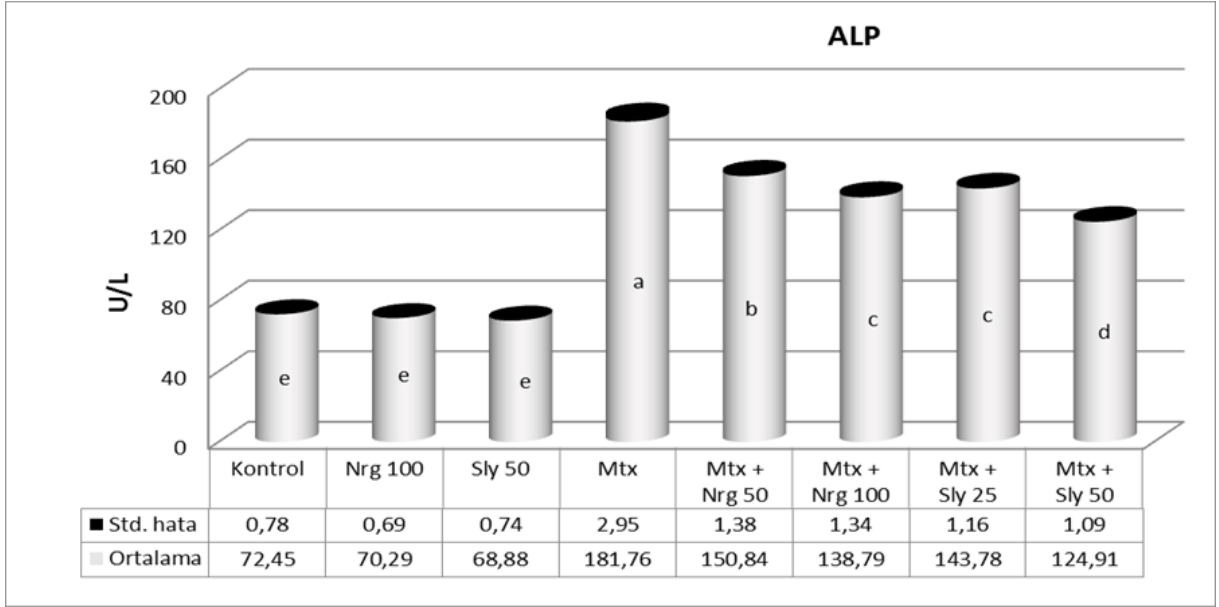
Şekil 1. Ratlarda methotrexate (MTX) kaynaklı karaciğer hasarında aspartat aminotransferaz (AST) enzim aktivitesi üzerine silymarin (SLY) ve naringin'in (NRG) etkisi. a-e gruplar arasındaki farklılığın önemini göstermektedir ($P<0.05$).

Figure 1. Effect of silymarin (SLY) and naringin (NRG) on aspartate aminotransferase (AST) enzyme activity in methotrexate (MTX)-induced liver injury in rats. a-e indicated significant differences between groups ($P<0.05$).



Şekil 2. Ratlarda methotrexate (MTX) kaynaklı karaciğer hasarında alanin aminotransferaz (ALT) enzimi aktivitesi üzerine silymarin (SLY) ve naringin'in (NRG) etkisi. a-e gruplar arasındaki farklılığın önemini göstermektedir ($P<0.05$).

Figure 2. Effect of silymarin (SLY) and naringin (NRG) on alanine aminotransferase (ALT) enzyme activity in methotrexate (MTX)-induced liver injury in rats. a-e indicated significant differences between groups ($P<0.05$).



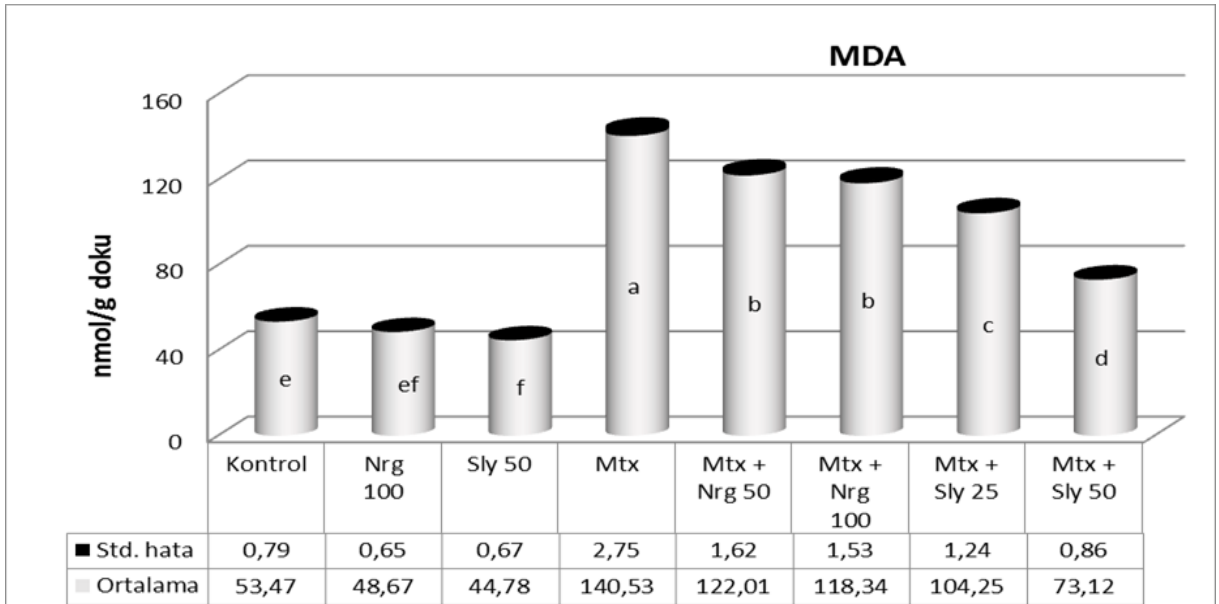
Şekil 3. Ratlarda methotrexate (MTX) kaynaklı karaciğer hasarında alkalen fosfataz (ALP) enzimi aktivitesi üzerine silymarin (SLY) ve naringin'in (NRG) etkisi. a-e gruplar arasındaki farklılığın önemini göstermektedir ($P<0.05$).

Figure 3. Effect of silymarin (SLY) and naringin (NRG) on alkaline phosphatase (ALP) enzyme activity in methotrexate (MTX)-induced liver injury in rats. a-e indicated significant differences between groups ($P<0.05$).

Lipid Peroksidasyonu

Oksidatif hasarın en önemli parametrelerinden biri olan MDA düzeyleri incelendiğinde MTX uygulamasının, karaciğer MDA düzeylerini kontrol

grubuna göre önemli ölçüde artırdığı ($P<0.05$) tespit edilmiştir. Silymarin ve naringin uygulamalarının her iki dozunun da artmış olan bu düzeyi düşürdüğü belirlenmiştir ($P<0.05$). (Şekil 4).



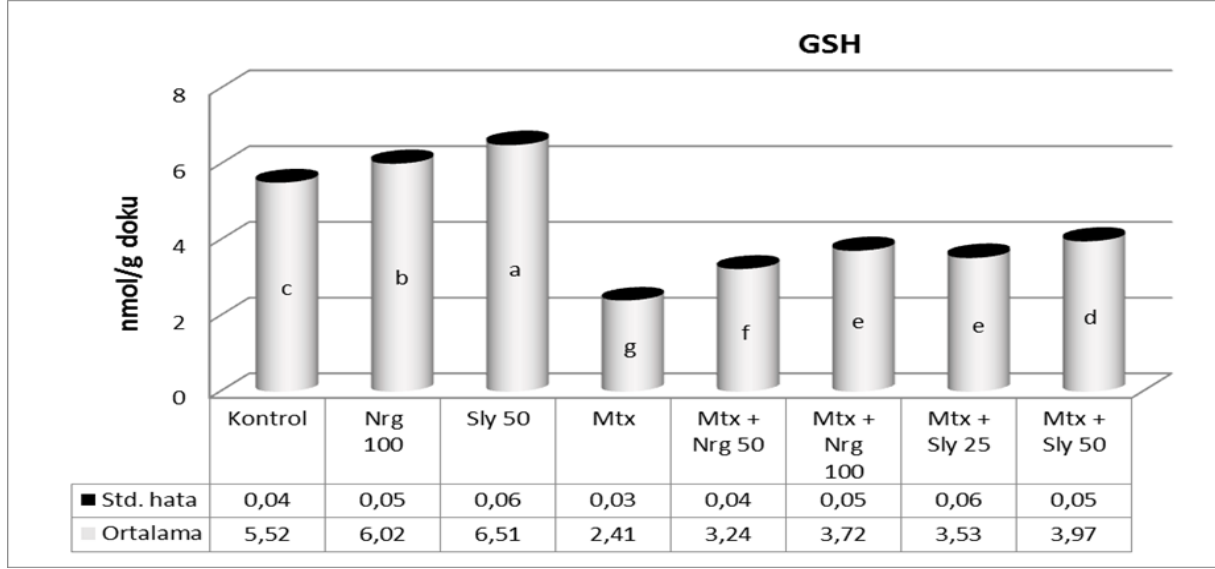
Şekil 4. Ratlarda methotrexate (MTX) kaynaklı karaciğer hasarında malondialdehit (MDA) seviyesi üzerine silymarin (SLY) ve naringin'in (NRG) etkisi. a-f gruplar arasındaki farklılığın önemini göstermektedir ($P<0.05$).

Figure 4. Effect of silymarin (SLY) and naringin (NRG) on malondialdehyde (MDA) level in methotrexate (MTX)-induced liver injury in rats. a-f indicated significant differences between groups ($P<0.05$).

Glutasyon Seviyesi ve Antioksidan Enzim aktiviteleri

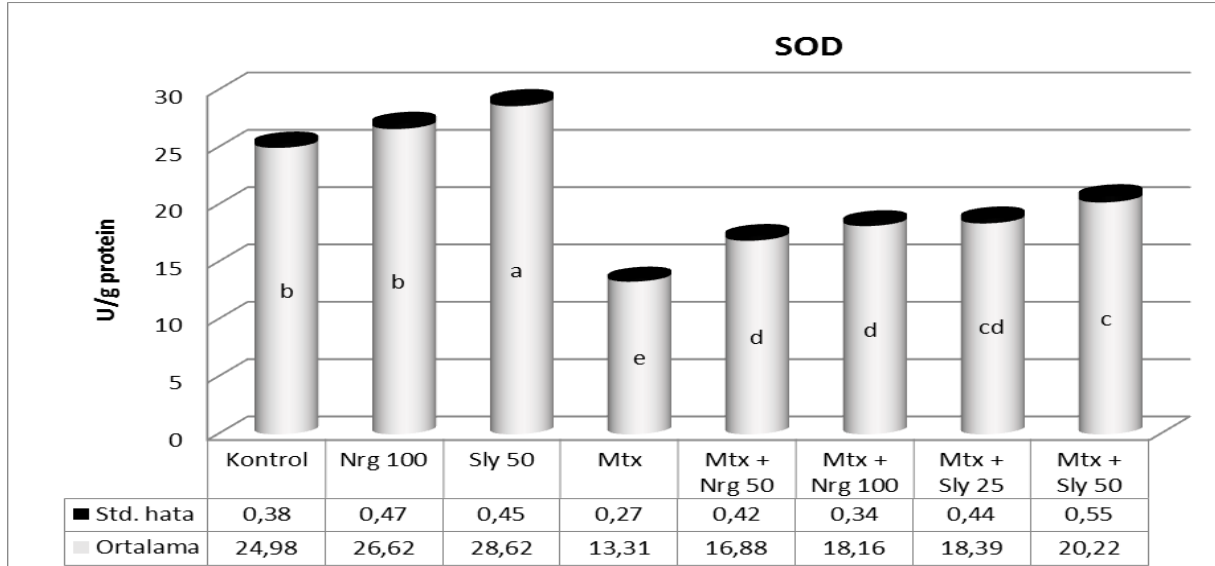
Methotrexate uygulamasının GSH seviyesini ve SOD, KAT ve GPx gibi antioksidan enzim aktivitelerini kontrol grubuna göre önemli ölçüde düşürdüğü ($P<0.05$) tespit edilmiştir. Methotrexate ile kombine

kullanılan silymarin (25 ve 50 mg/kg) ve naringin (50 ve 100 mg/kg) dozlarının SOD, KAT ve GPx gibi karaciğer antioksidan enzim aktivitelerini ve GSH düzeyini artırdığı ($P<0.05$) kaydedilmiştir (şekil 5, 6, 7, 8).



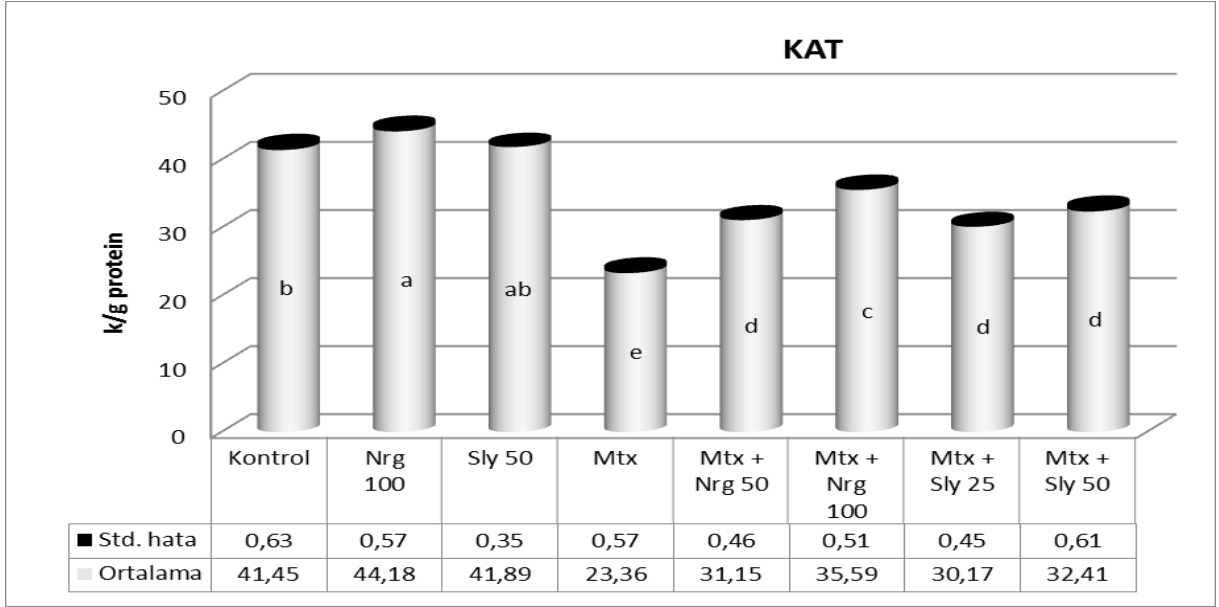
Şekil 5. Ratlarda methotrexate (MTX) kaynaklı karaciğer hasarında glutasyon (GSH) seviyesi üzerine silymarin (SLY) ve naringin'in (NRG) etkisi. a-g gruplar arasındaki farklılığın önemini göstermektedir ($P<0.05$).

Figure 5. Effect of silymarin (SLY) and naringin (NRG) on glutathione (GSH) level in methotrexate (MTX)-induced liver injury in rats. a-g indicated significant differences between groups ($P<0.05$).

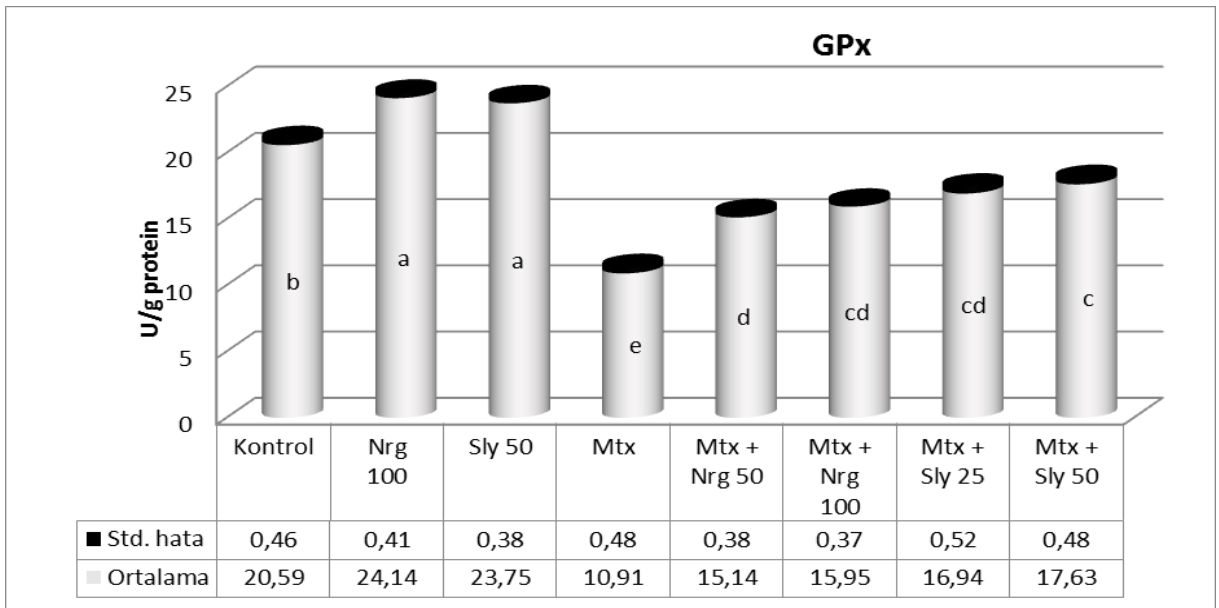


Şekil 6. Ratlarda methotrexate (MTX) kaynaklı karaciğer hasarında süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aktivitesi üzerine silymarin (SLY) ve naringin'in (NRG) etkisi. a-e gruplar arasındaki farklılığın önemini göstermektedir ($P<0.05$).

Figure 6. Effect of silymarin (SLY) and naringin (NRG) on superoxide dismutase (SOD) enzyme activity in methotrexate (MTX)-induced liver injury in rats. a-e indicated significant differences between groups ($P<0.05$).



Şekil 7. Ratlarda methotrexate (MTX) kaynaklı karaciğer hasarında katalaz (KAT) enzimi aktivitesi üzerine silymarin (SLY) ve naringin'in (NRG) etkisi. a-e gruplar arasındaki farklılığın önemini göstermektedir ($P<0.05$).
Figure 7. Effect of silymarin (SLY) and naringin (NRG) on catalase (CAT) enzyme activity in methotrexate (MTX)-induced liver injury in rats. a-e indicated significant differences between groups ($P<0.05$).



Şekil 8. Ratlarda methotrexate (MTX) kaynaklı karaciğer hasarında glutatyon peroksidaz (GPx) enzimi aktivitesi üzerine silymarin (SLY) ve naringin'in (NRG) etkisi. a-e gruplar arasındaki farklılığın önemini göstermektedir ($P<0.05$).
Figure 8. Effect of silymarin (SLY) and naringin (NRG) on glutathione peroxidase (GPx) enzyme activity in methotrexate (MTX)-induced liver injury in rats. a-e indicated significant differences between groups ($P<0.05$).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada methotrexate kaynaklı karaciğer toksisitesine karşı silymarin ve naringin'in yararlı etkileri sergilenmiştir. Methotrexate; romatoid artrit gibi otoimmün hastalıklar ve birçok kanser türünün tedavisinde sıklıkla tercih edilen bir ilaçtır (1). Karaciğer, böbrek ve nörotoksisite gibi istenmeyen birçok yan etkilere sahip olduğundan klinik kullanımı sınırlıdır (2). Methotrexate kaynaklı karaciğer toksisitesinin mekanizması henüz aydınlatılmamıştır. Önerilen bir mekanizmada, hücredeki methotrexate'ın hepatotoksisiteye neden olan folat seviyesinde tükenmeye yol açarak poliglutam formunda biriktiği düşünülmektedir. Bir başka mekanizma ise, oksidatif stresin, methotrexate ile uyarılan hepatotoksisitede önemli rol oynadığı düşünülmektedir (23,24). Karaciğer hastalıklarının teşhisinde en önemli biyomarker olan ALT, AST ve ALP enzimlerinin plazma ya da seruma geçişi karaciğer hasarı ya da yaralanmasının en önemli belirtisidir. Bu enzimlerin serumdaki seviyelerinin yükselmesi hepatositlerin yapısal bütünlüğünün hasar görmesi sonucu kana karışmalarından dolayı kaynaklanır (25). Yapılan bir çalışmada methotrexate kaynaklı karaciğer hasarı sonucunda serum AST, ALT ve ALP aktivitelerinin arttığı gözlemlenmiştir (26). Mevcut çalışmada methotrexate grubunda serum AST, ALT ve ALP aktivitelerinin kontrol grubuna göre arttığı saptanmıştır. Tedavi amacıyla verilen silymarin ve naringin'in, bu enzimlerin aktivitelerini methotrexate grubuna göre azalttığı belirlenmiştir.

Artan reaktif oksijen türleri (ROS) hücre membranlarına zarar vererek lipid peroksidasyonunun gerçekleşmesine neden olur. Lipid peroksidasyonu sonucunda, lipid peoksidasyonun son ürünü olan MDA seviyesi artar. MDA seviyesinin artması hücrelerin oksidatif hasara uğradığının en önemli bir göstergesidir (2). Yapılan çalışmada methotrexate ile toksikasyona uğramış gruptaki MDA seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükselmiştir. Methotrexate'ın dokuda oksidatif hasara neden olduğu daha önce yapılan birkaç çalışmayla desteklenmiştir (27,28).

Methotrexate ile birlikte verilen silymarin ve naringin ise MDA seviyesini kontrol grubuna yaklaştırmıştır. Silymarin ve naringin'in sırasıyla parasetamol ve CCl₄ gibi ajanların neden olduğu hepatotoksisite sonucu artan MDA seviyesini azalttığı bazı çalışmalar sonucunda rapor edilmiştir (29,30).

Düşük moleküler ağırlıklı bir tripeptit olan GSH, hücrel antioksidan görevi gören önemli bir bileşiktir. GSH peroksi radikalleri ve singlet oksijen gibi çeşitli serbest radikallerle reaksiyona girerek diğer disüflürlere ve indirgenmiş glutatyona (GSSG) dönüşür (2). Oksidatif stres, muhtemelen GSH içeriğindeki azalmadan ötürü methotrexate ile indüklenen hepatotoksisitenin patogeneğinde önemli rol oynamaktadır (5). Aşırı serbest radikallerin üretimi sonucunda organ hasarı gelişerek hücre membranlarının parçalanmasına neden olur. Böylece sitozolik nikotinamid adenosin difosfat (NADP) bağımlı dehidrogenazlar ve NADP malik enzimleri methotrexate tarafından inhibe edilerek hücrelerdeki mevcut NADPH miktarında azalmaya neden olur. Normal şartlar altında NADPH hücrel glutatyonu indirgenmiş glutatyona dönüştüren glutatyon redüktaz enzimi tarafından kullanılır. İndirgenmiş glutatyon ise ROS'e karşı koruyucu etki sağlayan önemli bir non-enzimatik sitozolik antioksidandır. Bu yüzden methotrexate, glutatyon seviyesini düşürerek hücrenin oksidatif hasara karşı daha savunmasız hale getirir (31,32). Yapılan çalışmada tedavi amacıyla verilen silymarin ve naringin'in methotrexate ile indüklenen gruba göre GSH seviyesini artırması önceki yapılan çalışmaları desteklemektedir. Silymarin ve naringin'in yararlı etkileri antioksidan özellikleriyle ilişkilidir, dolayısıyla reaktif türlerini nötralize edebilme kapasitesine sahip olduğu kanısına varılmıştır.

Artmış oksidatif stres, hücrel savunma mekanizmaları ile hücre içi serbest radikallerin ürünleri arasındaki dengesizliği temsil eder. Hem SOD hem de KAT, hücreyi hasardan korumanın en etkili yolu olan H₂O₂'yi parçalayıp ve O₂'i indirgeyerek oksidatif hasarı azaltırlar. Bu enzimler aktif oksijen türlerini ortadan kaldırmak için birlikte çalışırlar ve

fizyolojik konsantrasyonlarda aktivite veya miktarlarındaki azalma sonucu hücrel lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın oksidatif hasara karşı olumsuz etkilenmesine neden olurlar (33,34). GPx enzimi GSH vasıtasıyla H₂O₂' nin su ve oksijene dönüşümünü katalize ederek dokuları oksidatif hasara karşı korur (2). Yapılan literatür araştırmaları sonucu methotrexate'ın karaciğer, böbrek ve barsak gibi farklı dokularda antioksidan özellik gösteren SOD, KAT ve GPX enzim aktivitelerini azalttığı bildirilmiştir (7,27,35). Mevcut çalışmanın sonuçları ise önceki yapılan çalışmaları destekleyerek, methotrexate toksikasyonu sonucu bu antioksidan enzim aktivitelerinde kontrol grubuna göre azalış tespit edilmiştir. Silymarin ve naringin tedavisi, methotrexate grubu ile kıyaslandığında antioksidan enzim aktivitelerini artırmıştır. Bir başka çalışmada farelerde etanol kaynaklı karaciğer toksisitesine karşı tedavi amacıyla verilen silymarin, antioksidan enzim aktivitelerini ve GSH seviyesini arttırdığı rapor edilmiştir (36). Diğer bir çalışmada ise nikel kaynaklı karaciğer toksisitesine karşı naringin'nin antioksidan enzim aktivitelerini arttırdığı bildirilmiştir (37).

Sonuç olarak, bu çalışmada methotrexate'ın neden olduğu karaciğer hasarını silymarin ve naringin'in antioksidan etkileri ile azalttığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla karaciğer toksisitesini azaltmak için silymarin ve naringin kullanımının klinik açıdan yararlı olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Khan ZA., Tripathi R., Mishra B., 2012. Methotrexate: a detailed review on drug delivery and clinical aspects. *Expert Opin Drug Deliv*, 9, 151-169.
2. Ali N., Rashid S., Nafees S., Hasan SK., Sultana S., 2014. Beneficial effects of Chrysin against Methotrexate-induced hepatotoxicity via attenuation of oxidative stress and apoptosis. *Mol Cell Biochem*, 385, 215-223.
3. Mukherjee S., Ghosh S., Choudhury S., Adhikary A., Manna K., Dey S., Chattopadhyay S., 2013. Pomegranate reverses methotrexate-induced oxidative stress and apoptosis in hepatocytes by modulating Nrf2-NF-κB pathways. *J Nutr Biochem*, 24, 2040-2050.
4. Şener G., Ekşioğlu-Demiralp, E., Cetiner M., Ercan F., Şirvancı S., Gedik N., Yeğen BC., 2006. L-Carnitine ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury and inhibits leukocyte death. *Cell Biol Toxicol*, 22, 47-60.
5. Uraz S., Tahan V., Aygun C., Eren F., Unluguzel G., Yuksel M., Hulagu S., 2008. Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver toxicity. *Dig Dis Sci*, 53, 1071-1077.
6. Olayinka ET., Ore A., Adeyemo OA., Ola OS., 2016. Ameliorative effect of gallic acid on methotrexate-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rat. *J Xenobiotics*, 6(1).
7. Vardi N., Parlakpınar H., Ates B., 2012. Beneficial effects of chlorogenic acid on methotrexate-induced cerebellar Purkinje cell damage in rats. *J Chem Neuroanat*, 43, 43-47.
8. Ueki M., Ueno M., Morishita J., Maekawa N., 2013. Curcumin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by inhibiting renal inflammation in mice. *J Biosci Bioeng*, 115, 547-551.
9. Kiruthiga PV., Karutha PS., Pandima DK., 2014. Silymarin prevents the toxicity induced by benzo (a) pyrene in human erythrocytes by preserving its membrane integrity: An in vitro study. *Environ. Toxicol*, 29, 165-175.
10. Köksal E., Gülçin İ., Beyza S., Sarıkaya Ö., Bursal E., 2009. In vitro antioxidant activity of silymarin. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 24, 395-405.
11. Al-Rasheed N., Faddah L., Al-Rasheed N., Bassiouni YA., Hasan IH., Mahmoud AM., Yacoub HI., 2016. Protective effects of silymarin, alone or in combination with chlorogenic acid and/or melatonin, against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Pharmacogn Mag*, 12(Suppl 3), S337.
12. Pari L., Amudha K., 2011. Hepatoprotective role of naringin on nickel-induced toxicity in male Wistar rats. *Eur J Pharmacol*, 650, 364-370.

13. Gürsul C., Ekinci Akdemir FN., Akkoyun T., Can İ., Gül M., Gülçin İ., 2016. Protective effect of Naringin on experimental hindlimb ischemia/reperfusion injury in rats. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 31, 56-61.
14. Erboga M., Aktas C., Erboga ZF., Donmez YB., Gurel A., 2015. Quercetin ameliorates methotrexate-induced renal damage, apoptosis and oxidative stress in rats. *Renal Failure*, 37, 1492-1497.
15. Ghaznavi H., Mehrzadi S., Dormanesh B., Tabatabaei SM., Vahedi H., Hosseinzadeh A., Pazoki-Toroudi H., Rashidian A., 2016. Comparison of the protective effects of melatonin and silymarin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *J Evid Based Complementary Altern Med*, 21, NP49-55.
16. Sahu BD., Tatireddy S., Koneru M., Borkar RM., Kumar JM., Kuncha M., Sistla R. 2014. Naringin ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity and associated mitochondrial dysfunction, apoptosis and inflammation in rats: possible mechanism of nephroprotection. *Toxicol Appl Pharmacol*, 277, 8-20.
17. Placer ZA., Cushmanni LL., Johnson BC., 1966. Estimation of products of lipid peroxidation (as malondialdehyde) in biochemical systems. *Anal. Biochem*, 16, 359-364.
18. Aebi H., 1983. Catalase. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods in Enzymatic Analysis*. New York: Academic Press, 276-286.
19. Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL., Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*, 193, 265-275.
20. Sun Y., Larry WO., Ying LA., 1988. Simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 34, 497-500.
21. Sedlak J., Lindsay RHC., 1965. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann's reagent. *Anal Biochem*, 25, 192-205.
22. Lawrence RA., Burk RF., 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 71, 952-958.
23. Sathiavelu J., Senapathy GJ., Devaraj R., 2009. Hepatoprotective effect of chrysin on prooxidant-antioxidant status during ethanol-induced toxicity in female albino rats. *J Pharm Pharmacol*, 61, 809-817.
24. Prey S., Paul C., 2008. Effect of folic or folinic acid supplementation on methotrexate associated safety and efficacy in inflammatory disease: a systematic review. *Br. J. Dermatol*, 160, 622-628.
25. Hadi NR., Al-Amran FG., Swadi A., 2012. Metformin ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity. *J Pharmacol Pharmacother*, 3, 248-253.
26. Hafez HM., Ibrahim MA., Ibrahim SA., Amin EF., Goma W., Abdelrahman AM., 2015. Potential protective effect of etanercept and aminoguanidine in methotrexate-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Eur J Pharmacol*, 768, 1-12.
27. Dalaklioglu S., Genc GE., Aksoy NH., Akcıt F., Gumuslu S., 2013. Resveratrol ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of lipid peroxidation. *Hum Exp Toxicol*, 32, 662-671.
28. Kelleni MT., Ibrahim SA., Abdelrahman AM., 2016. Effect of captopril and telmisartan on methotrexate-induced hepatotoxicity in rats: impact of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Toxicol Mech Methods*, 26, 371-377.
29. Hamza RZ., Al-Harbi MS., 2015. Amelioration of paracetamol hepatotoxicity and oxidative stress on mice liver with silymarin and *Nigella sativa* extract supplements. *Asian Pac J Trop Biomed*, 5, 521-531.
30. Dong D., Xu L., Yin L., Qi Y., Peng J., 2015. Naringin prevents carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *J Funct Food*, 12, 179-191.
31. Çakır T., Özkan E., Dulundu E., Topaloğlu Ü., Şehirli AÖ., Ercan F., Şener G., 2011. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pharm Pharmacol*, 63, 1566-1571.

32. Abdel-Raheem IT., Khedr NF., 2014. Renoprotective effects of montelukast, a cysteinyl leukotriene receptor antagonist, against methotrexate-induced kidney damage in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 387, 341-353.
33. Nagi MN., Almakki HA., 2009. Thymoquinone supplementation induces quinone reductase and glutathione transferase in mice liver: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Phytother Res*, 23, 1295-1298.
34. Ince S., Keles H., Erdogan M., Hazman O., Kucukkurt I., 2012. Protective effect of boric acid against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Drug Chem Toxicol*, 35, 285-292.
35. Sukhotnik I., Nativ O., Roitburt A., 2013. Methotrexate induces germ cell apoptosis and impairs spermatogenesis in a rat. *Pediatr Surg Int*, 29, 179-184.
36. Das SK., Vasudevan DM., 2006. Protective effects of silymarin, a milk thistle (*Silybium marianum*) derivative on ethanolinduced oxidative stress in liver. *Indian J Biochem Biophys*, 43, 306-311.
37. Pari L., Amudha K., 2011. Hepatoprotective role of naringin on nickel-induced toxicity in male Wistar rats. *Eur J Pharmacol*, 650, 364-370.



Ratlarda Karbon Tetraklorür ile İndüklenen Karaciğer Toksikasyonu Üzerine Resveratrol'ün Koruyucu Etkisinin Histopatolojik ve TUNEL Metodu ile Araştırılması

Serkan YILDIRIM¹✉

1. Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received
13.02.2017

Kabul Tarihi/Accepted
03.04.2017

Yayın Tarihi/Published
30.10.2017

Öz: Bu çalışmada, deneysel olarak karbon tetraklorür ile hepatotoksisite oluşturulan ratların karaciğer dokuları üzerine güçlü antioksidan etkisine sahip olan Resveratrol'ün, histopatoloji ve TUNEL metodu ile koruyucu etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, 32 adet erkek Wistar cinsi Albino rat kullanıldı. Denekler rastgele seçilerek, 1. grup kontrol, 2. Grup CCl₄, 3. grup Resveratrol. 4. grup ise CCl₄+ Resveratrol olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Deneme sonunda hayvanlar anestezi altında sakrifiye edilerek histopatolojik analizler için karaciğer örnekleri %10 formalin solüsyonuna alındı. Yapılan histopatolojik incelemede kontrol ve Resveratrol grubunda ratların karaciğerleri normal histolojik yapıda olduğu tespit edildi. CCl₄ grubunda ise karaciğerin periasiner bölgelerindeki hepatositlerde şiddetli hidropik dejenerasyon, steatozis ve kogulasyon nekrozu tesbit edildi. CCl₄+ Resveratrol grubunda ratların karaciğerlerinde periasiner bölgede hepatositlerde hafif hidropik dejenerasyona rastlanırken nekrotik hepatositlere hiç rastlanmadı. Apoptozisi belirlemek amacıyla TUNEL metodu kullanıldı. TUNEL sonuçlarına göre kontrol ve Resveratrol grubunda karaciğerlerde birkaç hücrede pozitiflik tespit edildi. CCl₄ grubunda karaciğerlerin periasiner bölgelerindeki hepatositlerde çok sayıda pozitif hücre belirlendi. CCl₄+Resveratrol grubunda ratların karaciğerlerinde periasiner bölgede çok az sayıda pozitif hücreye rastlandı. İstatiski olarak gruplar arasındaki fark önemli (P<0.05) bulundu. Sonuç olarak, histopatolojik ve immunohistokimyasal bulgulara göre CCl₄ neden olduğu oksidatif strese ve lipidperoksidasyonu sonucu oluşturulan karaciğer hasarına karşı Resveratrolün bu hasarı önemli düzeyde inhibe edici etkisinin olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Apoptosis, Histopatoloji, Karbontetraklorür, Resveratrol, TUNEL metod.

Investigation by Histopathological and TUNEL Method of the Protective Effect of Resveratrol on Carbon Tetrachloride Induced Liver Toxicity in Rats

Abstract: In this study, it was aimed to investigate the protective effect of Resveratrol, which has a strong antioxidant effect on liver tissues, by histopathology and TUNEL method in experimental rats hepatotoxic with carbon tetrachloride. For this reason 32 male Wistar rats were used. Rats were randomly chosen and separated into 4 groups. First control, rats in second group CCl₄, 3rd group Resveratrol 4th group CCl₄+Resveratrol. At the end of the experiment, rats were euthanased under anaesthesia and liver samples were taken in formalin solution 10%. According to histopathological examination, livers were in normal histopathological structure in the control and Resveratrol groups. In CCl₄ group, severe hydropic degeneration in hepatocytes localised in the center regions of the liver, steatosis and coagulation necrosis were detected. In CCl₄+Resveratrol group; while slight hydropic degeneration were detected in the central regions of livers, necrotic hepatocytes were not detected. TUNEL method were used in order to detect apoptosis. According to TUNEL results, positivity was detected in certain liver cells in control and Resveratrol group. Numerous positive cells were detected in central regions of livers in CCl₄ group. Few positive cells were detected in central region of rat livers in CCl₄+Resveratrol group. Differences in groups were statistically significant (P<0.05). As a result of histopathological and immunohistochemical examination, inhibitor effect of resvetratrol were determined against liver damage resulting from oxidative stress and lipiperoxidation caused by CCl₄.

Keywords: Apoptosis, Carbon tetrachloride, Histopathology, Resveratrol, TUNEL method.

GİRİŞ

Karaciğer karın boşluğunda, diaframın altında yer alan vücudun en önemli organlarından birisidir. Karaciğer çeşitli fizyolojik olayların düzenlenmesinde hayati rol oynar. Depolama, sekresyon, ekskresyon, fagositoz, konjugasyon, metabolizma ve hemopoez gibi önemli fonksiyonları yerine getirmektedir (1,2). Endojen ve ekzojen toksik maddelerin detoksifikasyonunda ve faydalı ajanların sentezlenmesinde görev alır (1). Karaciğerin bu önemli fonksiyonlarından dolayı da günümüze kadar karaciğerle ilgili pek çok bilimsel araştırma yapılmıştır (3-7). Bu bağlamda karaciğer üzerinde hasar oluşturmak ve farklı fonksiyonlarını araştırabilmek amacıyla da karbontetraklorür (CCl₄) gibi pek çok ksenobiyotik ajanlar kullanılmıştır (8,9).

CCl₄ hepatotoksik etkisi bilinen ve üzerinde pek çok bilimsel çalışma yapılmış olan bir kimyasaldır. CCl₄ ile deneysel olarak oluşturulan intoksikasyondan esas etkilenen karaciğer olsa da bu toksikasyon sonucunda oluşan sirozdan böbrek, dalak, pankreas, timus, lenf düğümleri, akciğerler, kalp gibi pek çok organ ve dahil olduğu sistem doğrudan veya dolaylı olarak etkilenmektedir (3,10,11). CCl₄'ün düşük dozlarda uzun süre uygulandığında karaciğer hücrelerinde yağ dejenerasyonuna, yüksek dozlarda ise karaciğer hücrelerinin nekrozuna, hidropik dejenerasyona ve paraneşimde kanamalara neden olduğu bildirilmektedir. (9,12-14). CCl₄ ile oluşturulan toksikasyonda hücre hasarı, lipid peroksidasyonundaki artışa bağlıdır ve CCl₄'ün toksik etkisinin, serbest radikale dönüşümü ile başladığı belirlenmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda karaciğer hastalıklarında oksidatif stressin arttığını ve artan oksidatif stress ile karaciğer hasarı ve fibrozis arasında ilişki olduğunu bildirmişlerdir (13-15).

Bazı bitkilerin kullanımı ve farklı meyvelerin tüketimi insan sağlığı bakımında önemlilik arz etmektedir. Bu bağlamda fitokimyasallar olarak isimlendirilen, bitki ve meyvelerden elde edilen kimyasal bileşikler sağlıklı yaşam için elzemdir (16,17). Bu bağlamda son yıllarda tıp ve eczacılık

sektöründe çok dikkat çeken yaşlılık karşıtı özelliği ile bilinen Resveratrol önemli bir fenoldür (18). Resveratrol başlıca üzüm olmak üzere, dut, erik, limon, kiraz, yer fıstığı, fındık, zambak, ladin, yaban mersini ve akasya gibi pek çok bitkilerde bulunmaktadır (8). Resveratrol, güçlü antioksidan özelliği sayesinde serbest radikallerin yol açtığı hücre hasarını engellemeye yardımcı olduğu bildirilmiştir (16,19). Ayrıca yağların yükseltgenmesi sonucu bozulmasını ve buna bağlı hücre ölümünü engellediği bilinmektedir (8,16,20). Resveratrol yaşlanmayı geciktirdiği, kalp ve sinir hasarını engellediği, koroner kalp yetmezliği riskini azalttığı bildirilmiştir (11,21).

Yapılan literatür taramalarında karbon tetraklorür intoksikasyonun karaciğerin histopatolojisi üzerine etkilerini inceleyen yeterli sayıda araştırmaya rastlanılmamıştır. Bundan dolayı bu çalışmada; Karbontetraklorür ile indüklenen karaciğer toksisitesinde meydana gelebilecek değişiklikler ve bu toksikasyona karşı Resveratrol'un olası protektif etkileri histopatolojik ve TUNEL metodu ile incelenerek elde edilen bulgularla literatüre katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Etik izin

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (AÜHADYEK) tarafından 75296309-050.01.04-E.1700068324 sayı ve 11 nolu izin kararı ile etik kurallara uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Deneme prosedürü

Çalışmanın hayvan materyali, Yaklaşık 7-8 haftalık 32 adet erkek Wistar Albino rat kullanıldı. Ratların başlangıçtaki vücut ağırlıkları yaklaşık 250-300 g. olarak belirlendi. Denekler her grup 8 rat olacak şekilde rasgele seçilerek 4 gruba ayrılacaktır.

1. grup kontrol grubu (8 rat): 14 gün süreyle içme suyu verildi.

2. grup CCl₄ grubu (8 rat): Bu grupta ratlara 1.gün tek doz CCl₄ 2 ml/kg (Sigma, St. Louis, MO, USA) intraperitoneal olarak (1:1 oranında zeytinyağı ile süspanse) uygulandı.

3. grup Resveretrol grubu (8 rat): Bu grupta ratlara Resveratrol (Solgar, Inc. USA) oral yolla 30 mg/kg/gün 14 gün süreyle uygulandı.

4. grup CCl₄+ Resveretrol grubu (8 rat): Bu grupta ratlara 1. gün tek doz CCl₄ 2 ml/kg/gün intraperitoneal (1:1 oranında zeytinyağı ile süspanse) ve Resveratrol oral yolla 30 mg/kg/gün 14 gün süreyle uygulandı.

Ratlara 14 günlük deneme süresince 12 saat karanlık/aydınlatma uygulandı, sıcaklığı 22±2°C olarak ayarlanan odalarda, ad libitum olarak yem ve taze su bulunan kafeslerde barındırıldı. Deneme sonunda hayvanlar anestezi altında sakrifiye edilerek histopatolojik analizler için doku örnekleri %10 formalin solüsyonuna alındı.

Histopatolojik İnceleme

Deneme sonunda tüm ratların ötenazi sonrası nekropsileri yapılarak, özellikle karaciğer olmak üzere organlarda gözlenen makroskopik bulgular kaydedildi. Alınan doku örnekleri %10'luk tamponlu formol'de tespit edildikten sonra, parafinde bloklandı. Her blokta 4 µm kalınlığında alınan kesitler, hematoksilin-eozin ve TUNEL metodu ile boyanıp ışık mikroskopunda incelendi. Işık mikroskopunda incelenen kesitler yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirilip resimler çekildi.

TUNEL Boyama Protokolü

Nöron ve glialardaki DNA fragmentasyonunu göstermek için Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated-dUTP nick end labeling (TUNEL) metodu (In Situ Cell Death Detection Kit Roche Diagnostics; Cat. No. 11 684 817 910, Verison 13.0) seçildi. Hazırlanan preparatlar 37°C'de gece boyu deparafinizasyon işleminden sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek rehidrasyon işlemi uygulandı. Rehidrasyonun son aşaması olan distile

sudan çıkarılan preparatlar 2 kere 5'er dakika (2x5) PBS'de yıkandı. Daha sonra PBS'de yıkanan preparatlara %0.1'lik Proteinaz K damlatılarak 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Preparatlar PBS'de 2x5 dk yıkandı ve metanolde hazırlanan %3'lük H₂O₂ ile oda ısısında 15 dk inkübe edildiler. Tekrar PBS'de 2x5 dk yıkandıktan sonra preparatlar buharlı kabin içerisine yerleştirildi ve üzerlerine işaretleme tepkimesi için Terminal Deoksi Transferaz (TdT) reaksiyon karışımı damlatılarak 37°C'de, 60 dk inkübe edildi. Negatif kontrollere ise TdT enzim içermeyen solüsyondan damlatıldı. Preparatlar yine PBS'de 2x5 dk yıkandıktan sonra ilk aşama olan floresan mikroskopta ön değerlendirilmeleri yapıldı ardından her bir preparata 37°C'de 30 dk inkübe etmek üzere converter-POD solüsyonu eklendi. Preparatlar yine PBS'de 2x5 dk yıkandıktan sonra renk reaksiyonu için aminoethyl carbasole (AEC) kromojeni ile (Zymed, Lot: 60682605, USA) 5 dk inkübe edildi. Son olarak da preparatlar 3x3 dk PBS'de yıkandıktan sonra su bazlı yapıştırıcı ile yapıştırılarak ışık mikroskopunda (Olympus BX51) incelemeye alındı. Işık mikroskopunda incelenen kesitler pozitif hücre sayısına göre yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

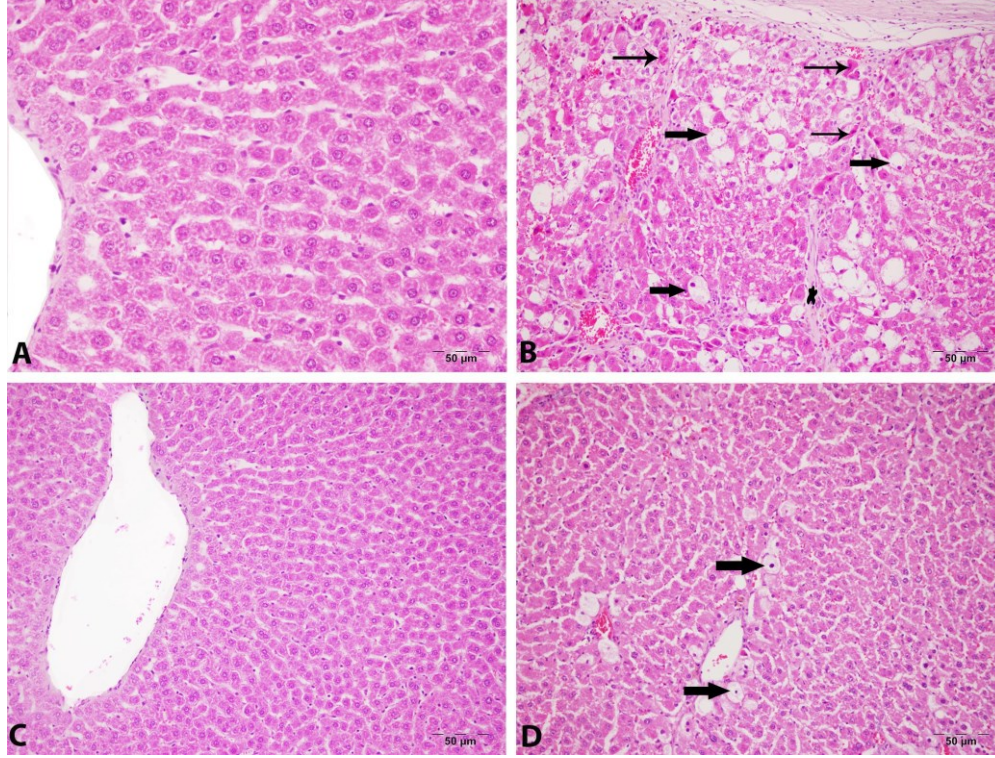
Histopatolojik incelemede semikantitatif olarak elde edilen verilerin gruplar arasındaki farklılıkların analizi için nonparametrik testlerden Kruskal-Wallis testi, ikili grupların mukayesesi için Mann Whitney U testi kullanıldı. Bu istatistik analizleri için SPSS 13.0 paket programı kullanıldı.

BULGULAR

Birinci (kontrol), gruptaki ratların karaciğerleri incelendiğinde normal histolojik yapıda olduğu tesbit edildi (Şekil 1). İkinci grup (CCl₄) olan CCl₄ grubunda ratların karaciğerlerinde bütün paranzim dokusunda dejeneratif nekrotik bulgular görülsede özellikle periasiner bölgede şiddetli hidropik dejenerasyon (%37), yağlı dejenerasyon (%37), koagülasyon nekrozu (%25), intrahepatik kolestazis, kupffer

hücrelerinde hiperplazi, portal bölgeden vena sentralisin çevresinde kadar ilerleyen mononükleer hücre infiltrasyonuna rastlandı (%37) (Şekil 2). Üçüncü Grup olan Resveratrol grubunda ki ratların karaciğerleri incelendiğinde hepatositlerin diziliminin, sünizoidal boşlukların, periasiner ve portal bölgenin normal histolojik yapıda olduğu

görüldü (Şekil 3). Dördüncü grup olan CCl₄+ Resveratrol grupta portal bölgede çok az hepatositte hidropik dejenerasyona (%12.5) ve mononükleer hücrelere (%12.5) rastlanırken steatozise ve nekroza hiç rastlanmadı (Şekil 4). Histopatolojik bulgular Tablo 1 de özetlendi.



Şekil 1: Kontrol grup, karaciğerin normal histolojik yapısı (A), CCl₄ grup, karaciğer periasiner bölgede koagülasyon nekrozu (ince oklar), hidropik dejenerasyon (kalın oklar), mononükleer hücre infiltrasyonu (asterisk) (B), Resveratrol grup, karaciğerin normal histolojik yapısı (C), CCl₄+ Resveratrol grup, karaciğer periasiner bölgede hidropik dejenerasyon (oklar), H&E, Bar: 50µm.

Figure 1: Control group, normal histological structure of liver (A), CCl₄ group, in liver periacinar region, coagulation necrosis (thin arrows), hydropic degeneration (thick arrows), mononuclear cell infiltration (asterisk) (B), Resveratrol group, normal histological structure of liver (C), CCl₄ + Resveratrol group, hydropic degeneration in the central region of the liver (arrows), H&E, Bar: 50µm.

Tablo 1: Histopatoloji değerlendirme tablosu.

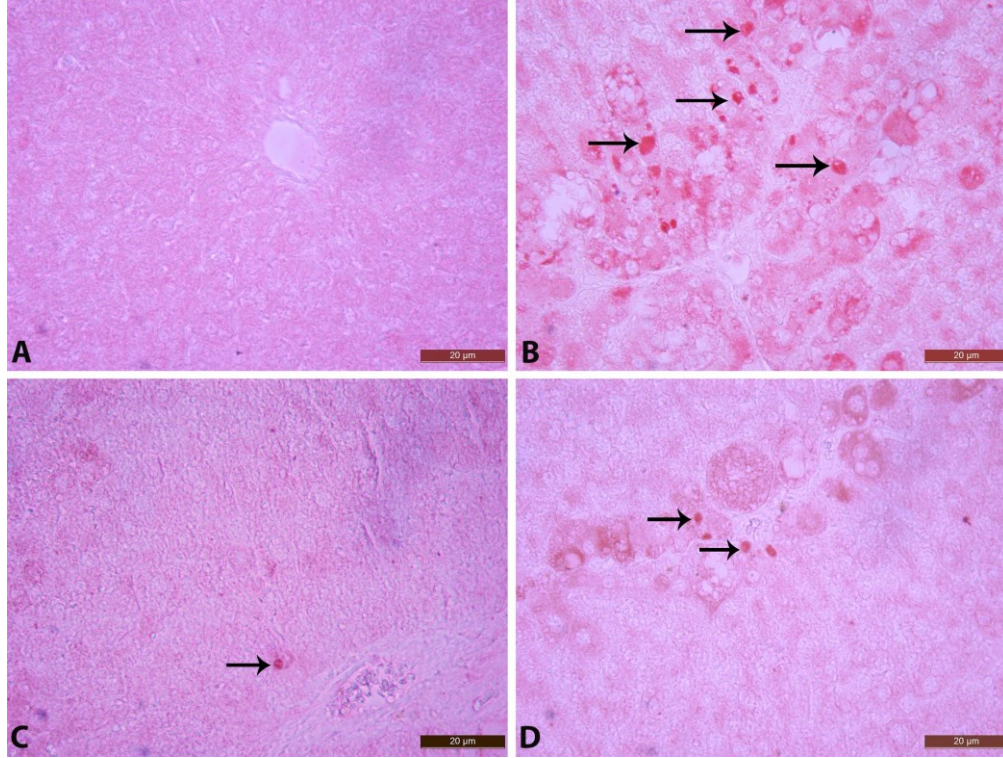
Table 1: Histopathology evaluation table

Gruplar	Hidropik degenerasyon	Steatozis	Koagülasyon nekrozu	Mononükleer hücre infiltrasyonu
Kontrol	-	-	-	-
CCL ₄	+++	+++	++	+++
Resveratrol	-	-	-	-
CCL ₄ +Resveratrol	+	-	-	+

İmmunohistokimya Bulguları

Apoptozisi tesbit etmek için yapılan TUNEL boyamada, birinci grup olan kontrol grubunda bir-iki hepatostin pozitif olduğu belirlendi. İkinci grup olan CCL₄ grubunda ise özellikle periasiner bölgede çok sayıda pozitif hücreye rastlandı. Üçüncü grup olan Resveratrol grubunda bazı ratların karaciğerinde çok

az sayıda pozitif hücreye rastlanırken bazılarında ise hiç pozitif hücreye rastlanmadı. Dördüncü grup olan Res+ CCL₄ grubunda ise ikinci gruba kıyasla daha az hücrede pozitif boyanmalara rastlandı (Tablo 2). CCL₄ grubunda karaciğerde TUNEL pozitif hücrelerin sayısı Res+ CCL₄ grubundan istatistiki açıdan ($P<0.05$) anlamlı bir fark tesbit edildi (Tablo 3-4, Şekil 3-4).



Şekil 2: Kontrol grup, normal karaciğer görünümü (A), CCl₄ grup, karaciğer periasiner bölgede apoptotic hücreler (oklar) (B), Resveratrol grup, normal karaciğer görünümü, apoptotic hücre (ok) (C), CCl₄+ Resveratrol grup, karaciğer periasiner bölgede az sayıda apoptotic hücre (oklar), TUNEL boyama, Bar: 20 µm.

Figure 2: Control group, normal histological structure of liver (A), CCl₄ group, apoptotic cells in the periacinar region of the liver (arrows) (B), Resveratrol grup, normal histological structure of liver, apoptotic cell (arrow) (C), CCl₄ + Resveratrol group, small number of apoptotic cells (arrows) in liver central region, TUNEL method, Bar: 20µm.

Tablo 2: Karaciğerde TUNEL pozitif boyalı hepatositler (%).

Table 2: TUNEL positive stained hepatocytes in liver (%).

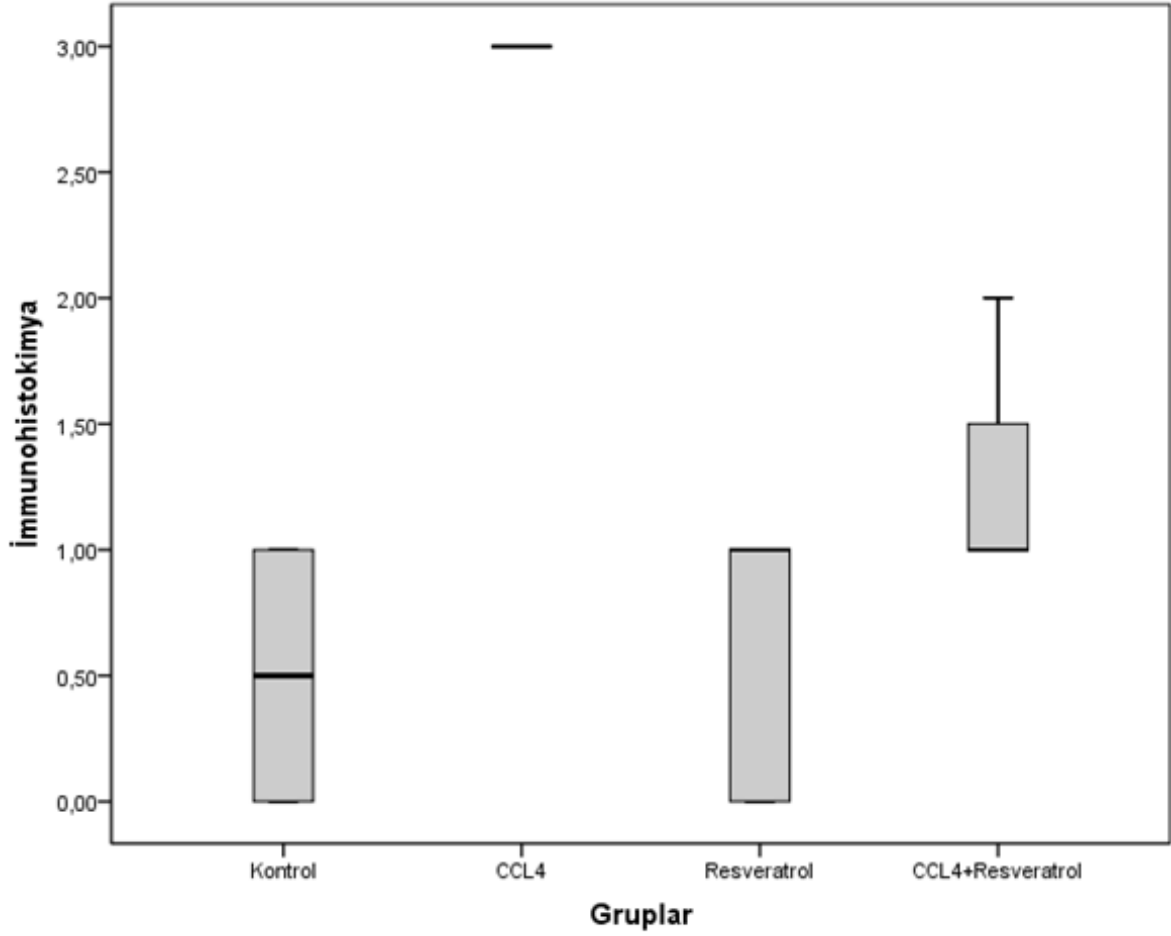
Gruplar	1.Rat	2.Rat	3.Rat	4.Rat	5.Rat	6.Rat	7.Rat	8.Rat
Kontrol	-	+	-	-	+	-	+	+
CCL ₄	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Resveratrol	+	+	+	-	-	-	+	+
CCL ₄ +Resveratrol	+	+	++	++	+	+	+	+

Tablo 3: Kruskal-Wallis testi İstatistik sonuçları**Table 3:** Kruskal-Wallis test Statistical results

Gruplar	Ortalama	Standart hata	Medial P
Kontrol	0.500	0.189	0.500*
CCl ₄	3.000	0	3.00*
Resveratrol	0.625	1.83	1.00*
CCl ₄ +Resveratrol	1.250	1.64	1.00*

P< 0.05 Kruskal-Wallis test sonuçlarına göre gruplar arasında fark önemlidir.

Gruplar arası farklılıklar için yapılan Kruskal-Wallis testi sonuçlarına göre Gruplar arasındaki fark önemli olduğu bulundu.



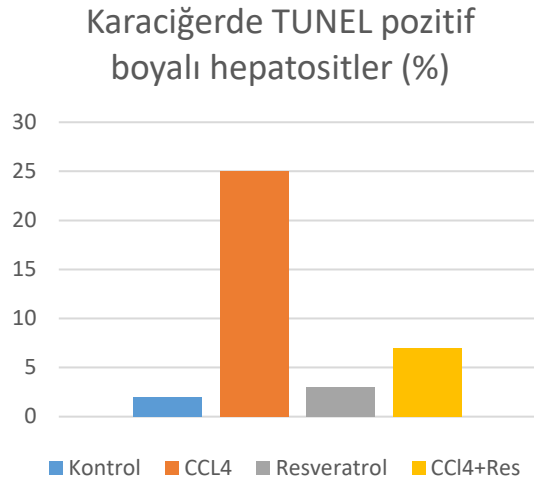
Şekil 3: Kruskal-Wallis testi, İstatistik sonuçları grafiği, bu grafik tablo 3'den elde edilen quantitatif immunohistokimyasal verileri özetlemektedir. (P<0.05 Kruskal-Wallis test).

Figure 3: The Kruskal-Wallis test, the graph of the statistical results, summarizes the quantitative immunohistochemical data obtained from this graphical table 3. (P<0.05; 0.05 Kruskal-Wallis test).

Tablo 4: Mann-Whitney U testi istatistik sonuçları.**Table 4:** Mann-Whitney U test statistical results.

1.-2. Gruplar	1.-3. Gruplar	1.-4. Gruplar	2.-3. Gruplar	2.-4. Gruplar	3.-4. Gruplar
0.01	NS	0.05	0.01	0.01	0.05

İkili gruplar arası farklılıklar için yapılan Mann-Whitney U testi sonuçlarına göre 1. ve 3. gruplar arasındaki fark önemli değilken diğer grupların kendi aralarındaki fark önemli olduğu bulundu.



Şekil 4: TUNEL boyalı alanların tüm alana oranı (%).
Figure 4: Calculating the proportion (%) of TUNEL staining areas to total area (%).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Karaciğer fizyolojik fonksiyonları nedeniyle tüm canlılar için büyük önem arz etmekte ve günümüzde karaciğerle ilgili olarak pek çok araştırma yapılmaktadır (17,22,23). Bu bağlamda karaciğer üzerinde hasar oluşturmak ve farklı fonksiyonlarını araştırabilmek amacıyla da CCl₄ gibi pek çok ksenobiyotik ajanlar kullanılmıştır (3,22,24). CCl₄ kuru temizleme sanayide yaygın bir şekilde endüstriyel bir çözücü olarak kullanılmaktadır. Sanayide çalışan insanlar dikkat etmediği sürece CCl₄ intoksikasyonuna maruz kalabilmekte, akut veya kronik hepatotoksisite oluşabilmektedir (3). CCl₄ ile indüklenmiş hepatotoksisitenin en çarpıcı histopatolojik özelliği lipid peroksidasyonunu artırarak reaktif oksijen radikallerini artırması sonucunda karaciğerde nekroz, siroz ve hepatik steatozise neden olmasıdır (3,22,24). Deneysel olarak intraperitoneal yolla CCl₄ uygulanmasının karaciğerde özellikle periasiner bölgede bulunan hepatositlerde hidropik dejenerasyon, yağ dejenerasyonu, koagülasyon nekrozuna, hepatositlerin anormal dizilimine, periasiner ve sinüzoidal konjesyona ve iflamasyona neden olduğu bildirilmiştir (3,22,24,25). Yapılan bu çalışmada CCl₄ uygulanan grupta daha önceki yapılan çalışmalara benzer bulgulara rastlanmıştır.

Apoptozis; fizyolojik ve patolojik durumlarda hasarlanmış ya da neoplastik hücrelere dönüşme potansiyeline sahip olan hücrelerin uzaklaştırılmasında başvurulan bir hücre intihar mekanizmasıdır. Yani programlanmış hücre ölümüdür, hücre içi ve hücre dışı uyarımlar sonucu gerçekleşir (26). CCl₄ pek çok çalışmada oksidatif stresi artırarak apoptozisi uyardığı bildirilmiştir (22,24). TUNEL metodu ile apoptozisin belirlendiği çalışmalarda CCl₄ intoksikasyonunda karaciğerin periasiner bölgelerinde bulunan hepatositlerde belirgin düzeyde apoptotik hücre tesbit edilmiştir (25). Shi (23) tarafından yapılan bir çalışmada periasiner bölgede apoptozisin önemli markırlarından biri olan caspase 3 ün arttığı tesbit edilmiş, bu artan apoptozisin yangıyı ve oksidatif stresi artırmış olabileceği vurgulanmıştır. Yapılan bu çalışmada özellikle periasiner bölgede apoptozisin artması ile daha uzun süre CCl₄ uygulanan ratların karaciğerlerinde gözlenen daha şiddetli yangı ve oksidatif hasar markırlarının artması önceki çalışmaları destekler niteliktedir (27).

Wang ve ark (9), rifampicinle oluşturdukları karaciğer hasarında apoptozis değerlendirmesinde casase 3 ve TUNEL metodunu karşılaştırmalı olarak değerlendirmiş ve her ikisinde de benzer bulgulara rastladığını belirtmiştir. Chan ve ark (18), akut CCl₄ toksikasyonunda da TUNEL metodu ile yaptıkları değerlendirmede karaciğerin periasiner bölgelerinde yoğun olarak pozitif hücrelere rastladığını ifade etmiştir. Bizim çalışmamızda da yine kontrol ve Resveratrol gruplarında bir-iki pozitif hücreye rastlanırken CCl₄ grubunda özellikle periasiner bölgede pek çok hücrenin apoptozisi tesbit edildi. Resveratrol + CCl₄ ise çok az sayıda pozitif hücre belirlendi. Bu bulgular yapılan diğer çalışmalarla uyumluluk ve paralellik göstermektedir.

Resveratrol karaciğer hastalıklarının tedavisi ve önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Son çalışmalar Resveratrolün nörodejeneratif bozukluklar, kardiovasküler hastalıklar, iskemik kalp hasarı, nefrotoksisite viral ve bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde ve hastalığın ilerlemesinin engellenmesinde önemli rol oynadığını

göstermektedir (10,11,18,28,29). Deneysel olarak Dimethylnitrosamine, CCl₄, etanol, aflatoksinler ve methotrexate gibi çeşitli ajanlarla karaciğer fibrozisi ve karaciğer hasarı oluşturulduğunu belirlenen pek çok çalışma mevcuttur (3-7,17). Bu hepatotoksik etkiyi koruyucu ve tedavi edici olarak çok geniş skalada bitki ve ilaç kullanılmaktadır (8). Daha önceki çalışmalarda Resveratrol uygulamasının oksidatif hasarı azaltarak ve lipid peroksidasyonunu inhibe ederek karaciğer hasarını ve sirozu engellediği bildirilmiştir (6,30). Yapılan bu çalışmada ise CCl₄ ile oluşturulan karaciğer toksikasyonunda Resveratrol uygulamasının karaciğerde anlamlı ölçüde karaciğer hasarını engellediği ve apoptotic hücre sayısını istatistiksel açıdan anlamlı ölçüde azalttığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak, histopatolojik ve immunohistokimyasal bulgulara göre Resveratrolün karaciğer hasarını önemli düzeyde inhibe edici etkisinin olduğu belirlenmiştir. Muhtemelen bu etki Resveratrolün antioksidan, anti-inflamatuvar, antiapoptotik ve protektif etkilerinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Çavusoglu H., 1996. Tibbi Fizyoloji, 9 ed., Yüce Yayınları, Alemdar Ofset, İstanbul.
2. Junqueira LC., Carneiro J., 2003. Basic Histology 10th ed., McGraw Hill Companies Incorporated, New York.
3. Çınar A., Yörük M., Meral İ., Kiliçalp D., Koç A., Ertekin A., 1999. The effects of carbon tetrachloride (CCl₄) induced experimental acute and chronic intoxication on histological structure of liver and some hematological values and electrocardiogram in Rabbits. Turk J Vet Anim Sci, 23, 235-242.
4. Hong SW., Jung KH., Zheng HM., Lee HS., Suh JK., Park IS., Hong SS., 2010. The protective effect of Resveratrol on dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. Arch Pharm Res, 33, 601-609.
5. Kasdallah-Grissa A., Mornagui B., Aouani E., Hammami M., Gharbi N., Kamoun A., El-Fazaa S., 2006. Protective effect of Resveratrol on ethanol-induced lipid peroxidation in rats. Alcohol Alcohol, 41, 236-239.
6. Tunalı-Akbay T., Sehirli O., Ercan F., Sener G., 2010. Resveratrol protects against methotrexate-induced hepatic injury in rats. JPPS, 13, 303-310.
7. Tahan G., Tarcin O., Tahan V., Eren F., Gedik N., Sahan E., Yucel O., 2007. The effects of N-acetylcysteine on bile duct ligation-induced liver fibrosis in rats. Dig Dis Sci., 52, 3348-3354.
8. Muriel P., Rivera-Espinoza Y., 2008. Beneficial drugs for liver diseases. Journal of Applied Toxicology, 28, 93-103.
9. Wang C., Fan RQ., Zhang YX., Nie H., Li K., 2016. Naringenin protects against isoniazid-and rifampicin-induced apoptosis in hepatic injury. World J Gastroenterol, 22, 9775-9783.
10. Karakuş A., Değer Y., Yıldırım S., 2016. Protective effect of Silybum marianum and Taraxacum officinale extracts against oxidative kidney injuries induced by carbon tetrachloride in rats. Ren Fail, 39, 1-6.
11. Mukhopadhyay P., Mukherjee S., Ahsan K., Bagchi A., Pacher P., Das DK., 2010. Restoration of altered microRNA expression in the ischemic heart with Resveratrol. PLoS One, 5, e15705.
12. Bhuvaneshwari R., Chidambaramathan N., Jegatheesan K., 2014. Hepatoprotective effect of embilica officinalis and its silver nanoparticles against ccl4 induced hepatotoxicity in wistar albino rats. DJNB, 9, 223-235.
13. MacDonald-Wickks LK., Garg ML., 2003. Vitamin E supplementation in the mitigation of carbon tetrachloride induced oxidative stress in rats. Nutr Biochem, 14, 211-218.
14. Sotelo-Feliz JL., Martinez-Fong D., Muriel P., Santillan RL., Castillo D., Yahuaca P., 2002. Evaluation of the effectiveness of Rosmarinus officinalis (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. J Ethnopharmacol, 81, 145-154.
15. Galicia-Moreno M., Rodriguez-Rivera A., Reyes-Gordillo K., Segovia J., Shibayama M., Tsutsumi V.,

- Muriel P., 2009. N-acetylcysteine prevents carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis: role of liver transforming growth factor-beta and oxidative stress. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 21, 908-914.
16. Marchal J., Pifferi F., Aujard F., 2013. Resveratrol in mammals: effects on aging biomarkers, age-related diseases, and life span. *Ann N Y Acad Sci*, 1290, 67-73.
17. Yıldırım S., Yener Z., 2016. Immunohistopathological and biochemical study of the effects of Dead Nettle (*Urtica Dioica*) extract on preventing liver lesions induced by experimental aflatoxicosis in Rats. *WIMJ*, DOI: 10.7727/wimj.2016.126.
18. Chan CC., Cheng LY., Lin CL., Huang YH., Lin HC., Lee FY., 2011. The protective role of natural phytoalexin Resveratrol on inflammation, fibrosis and regeneration in cholestatic liver injury. *Molecular nutrition & food research*, 55, 1841-1849.
19. Sinha K., Chaudhary G., Gupta YK., 2002. Protective effect of Resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Life sciences*, 71, 655-665.
20. Chan CC., Lee KC., Huang YH., Chou CK., Lin HC., Lee FY., 2014. Regulation by Resveratrol of the cellular factors mediating liver damage and regeneration after acute toxic liver injury. *JGH*, 29, 603-613.
21. Bradamante S., Barengi L., Villa A., 2004. Cardiovascular protective effects of Resveratrol. *Cardiovascular Therapeutics*, 22, 169-188.
22. Dinçel GÇ., Atasever A., Yaman D., 2016. Nitric oxide and glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in the liver parenchyma in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 22, 671-678.
23. Shi J., Aisaki K., Ikawa Y., Wake K., 1998. Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride. *AJP*, 153, 515-525.
24. Suzek H., Celik I., Dogan A., Yıldırım S., 2016. Protective effect and antioxidant role of sweetgum (*Liquidambar orientalis*) oil against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Pharm Biol.*, 54, 451-457.
25. Kaneko M., Nagamine T., Nakazato K., Mori M., 2013. The anti-apoptotic effect of fucoxanthin on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *J Toxicol Sci*, 38, 115-126.
26. Öktem S., Özhan MH., Özol D., 2001. Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi*, 2, 91-95.
27. Karaman M., Özen H., Dağ S., Atakisi O., Cıgır G., Kaya O., 2017. Ameliorative effect of omega-3 in carbon tetrachloride toxicity. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 23(1), 77-85.
28. Khan RA., Khan MR., Sahreen S., Bokhari J., 2010. Prevention of CCl 4-induced nephrotoxicity with *Sonchus asper* in rat. *FCT*, 48, 2469-2476.
29. Paolillo R., Carratelli CR., Rizzo A., 2011. Effect of Resveratrol and quercetin in experimental infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *International immunopharmacology*, 11, 149-156.
30. Schmatz R., Perreira LB., Stefanello N., Mazzanti C., Spanevello R., Gutierrez J., Zanini D., 2012. Effects of Resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochimie*, 94, 374-383.



Van Kedisi Eritrositi'nden 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz Enzimi (E.C. 1.1.1.44)'nin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Kinetik Özellikleri*

Serpil KILIÇ¹, Fikret KARATAŞ²

1. Akdeniz Üniversitesi, Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi, Antalya, TÜRKİYE.
2. Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Elazığ, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
09.11.2016	03.04.2017	30.10.2017

Öz: Bu çalışmada, 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimi (6PGD; E.C.1.1.1.44) Van Kedisi eritrositinden afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Netilmicin sülfat, Ampicillin ve Amoxicillin'in inhibitör etkisi incelendi. Enzim aktivitesi Beutler metoduna göre spektrofotometre ile 340 nm'de ölçüldü. Sonra enzimin optimum pH ve optimum sıcaklığı sırasıyla 8.0 ve 50 °C olarak tespit edildi. Enzimin saflığı sodyumdodesilsülfat- poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile kontrol edildi. 6PGD eritrositi için saflaştırma oranı 1787 olarak bulundu. NADP⁺ ve 6PGA substratları için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Netilmicin sülfat, Ampicillin ve Amoxicillin'in inhibitör etkileri incelendi, K_i değerleri ve inhibisyon tipleri Lineweaver-Burk grafiğinden tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Afinite kromatografisi, 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimi, eritrosit, kinetik özellikler, Van Kedisi.

Purification, Characterisation and Kinetic Properties of 6-Phosphogluconate Dehydrogenase Enzyme (E.C. 1.1.1.44) from the Van Cat Erythrocyte

Abstract: In this study, 6-phosphogluconate dehydrogenase enzyme (6PGD; E.C.1.1.1.44) was purified from erythrocyte the Van Cat by affinity chromatography. The inhibitor effect of Netilmicin sulphate, Ampicillin and Amoxicillin were also examined. Enzyme activity was measured by spectrophotometer according to Beutler method at 340 nm. Then the optimum pH and optimum temperature of the enzyme were determined to be 8.0 and 50 °C, respectively. In order to control the purification of enzyme, sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used. The purification rate for erythrocyte 6PGD was found as 1787. K_M and V_{max} were also determined for NADP⁺ and 6PGA as substrates. The inhibitor effect of Netilmicin sulphate, Ampicillin and Amoxicillin were also examined and K_i values and the types of inhibition were determined by the Lineweaver-Burk graph.

Keywords: Affinity chromatography, 6-Phosphogluconate dehydrogenase enzyme, erythrocyte, kinetic properties, Van Cat.

[✉]Serpil KILIÇ

Akdeniz Üniversitesi, Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi, Antalya, TÜRKİYE.
e-posta: serpilkilic@akdeniz.edu.tr

*Bu çalışma, Serpil Kılıç'ın "Van kedisi'nden 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz Enzimi (E.C. 1.1.1.44)'nin Saflaştırılması, Karakterizasyonu, Kinetiği ve HPLC İle Tayin Metodunun Geliştirilmesi" başlıklı doktora tezinin bir kısmından özetlenmiştir.

GİRİŞ

Enzimler, canlı organizmadaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşmasına fırsat vermeden %100'lük bir ürün verimi sağlayan protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Bu katalizörlerin en önemli özellikleri; katalizleme güçleri ve spesifiklikleridir. Bunlardan biri olan 6-Fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD; E.C.1.1.1.44), heksosmonofosfat yan yolu olarak da bilinen pentoz fosfat metabolik yolunun ikinci oksidatif basamağını katalizleyen önemli bir enzimdir ve bu tepkime sonucu D-ribuloz-5-fosfat, CO₂ ve NADPH+H⁺ oluşur (1,2).

6-Fosfoglukonat dehidrogenaz'ın defektif varyantları, ilk olarak 1964 yılında Brewer ve Dern tarafından, siyah bir Amerikan ailesinde tanımlanmış ancak fertlerde hemolitik anemi saptanmamıştır. Enzim eksikliği sonucu oluşan kronik hemolitik anemi vakaları ise daha sonraki yıllarda rapor edilmiştir (3-5). Bu enzimin eksikliği hücrede 6-fosfoglukonat (6-PG)'in birikmesine, fosfoglukoz izomerazın ve glukoz metabolizmasının tümüyle inhibe olmasına bağlı olarak toksik etki yaratmaktadır. Bu nedenle kemoterapilerde hedef enzim olarak yararlanılabilir (6).

Inhibitörler, enzimatik aktiviteyi kontrol eden bu küçük moleküller, biyolojik sistemler üzerinde büyük ölçüde kontrol sağladıkları için çok önemlidirler. Birçok ilaç ve toksik madde de enzim inhibitörü gibi davranırlar. Enzimatik inhibisyon dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere başlıca iki şekilde sınıflandırılır. Dönüşümsüz inhibisyonda, enzimin bir veya daha fazla fonksiyonel grubu etkilenir (7). Enzim aktivatörleri ise genellikle küçük iyonlar veya fazla büyük olmayan moleküllerdir. Bunlar kofaktörlerin aksine kataliz olayına her zaman katılmazlar. Aktivatörleri iki grupta toplamak mümkündür. Birinci gruptakiler sadece substratla birleşerek aktivatör rolü oynayan bileşikler iken ikinci gruptakiler ise serbest enzimle birleşerek aktivatör rolü oynayan bileşiklerdir (8).

6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin daha önceden birçok canlı ve dokulardan saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılmıştır. Fakat Van Kedisi üzerinde bu saflaştırma yapılmamış ve özellikleri araştırılmamıştır. Bu çalışmada, Van Kedisi eritrositlerinden 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılıp enzimin karakterizasyonu incelenmiştir. Saflaştırılan bu enzim üzerine çeşitli ilaçların in vitro olarak inhibisyon etkilerinin araştırılarak benzer çalışmalarla karşılaştırılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Kan Örneklerinin Alınması ve Hemolizatin Hazırlanması

Araştırma için Van Kedisi Araştırma Merkezi'nde barındırılan; 1-4 yaş aralığında, ortalama canlı ağırlıkları 2950-3170 g dişi ve 3350-5220 g erkek olan Van Kedileri kullanıldı. Deney için alınan kedi kanı, antikoagulant olarak kullanılan EDTA'lı tüplere alındı. Böylece hem pıhtılaşma önlenmiş hem de eritrositler için iyi bir beslenme ortamı sağlanmış oldu. Kanlar alındıktan sonra 4°C'de muhafaza edildi ve en çok iki gün içerisinde kullanıldı.

Eritrositleri ayırmak için tüplere konuldu. Yirmi dakika 1500 rpm'de santrifüj edildi. Sonra tüplerin üst kısmındaki plazma ve lökosit tabakası dikkatli bir şekilde ayrıldı. Altta kalan eritrositler, 0.16 M KCl çözeltisi ile üç defa yıkayıp üstteki kısımlar atıldı. Eritrositlerin hacimleri 5 hacim distile buzlu su ile hemoliz edildi. Hemolizin tam gerçekleşmesi için 4°C'de yarım saat karıştırıldı. Hücre zarlarından ayırmak için hemolizat 12000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi. Tüplerin dibindeki beyaz renkli hücre zarları atılıp üstteki hemolizat dikkatli bir şekilde alındı. Hücre zarlarından arındırılmış olan hemolizatin pH'sı katı potasyum fosfat ile 6'ya ayarlanarak, hemolizat kolona tatbik edilecek duruma getirildi (9, 10).

Afinite Jelinin Hazırlanması

On ml'lik yatak hacmi için 2 g kuru 2',5'- ADP-Sepharose 4B jeli tartıldı. Safsızlıkların uzaklaştırılması için 400 ml distile su ile birkaç defa yıkandı. Yıkama esnasında jel şişti. Bütün bu işlemler laboratuvar şartlarında yapıldı. Şişmiş jelin havası alındıktan sonra % 25 dengeleme tamponu (0.1 M K-Asetat / 0.1 M K-Fosfat) ve % 75 jel olacak şekilde, jel süspanse edildi. Süspanse edilen jel (1.3x10) kolona paketlenildi. Daha sonra dengeleme tamponu ile dengelendi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa kullanılarak dengeleme tamponu ile yıkandı. Dengeleme ve yıkamada akış hızı 20 ml/saat olarak uygulandı. Kolonun dengelenmiş olduğu elüat absorbansı ile tampon absorbansının eşitlenmesinden anlaşıldı (11).

Eritrosit Hemolizatının Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzim Elüsyonu

Hazırlanan afinite jeli 1.3x10 cm boyutundaki kolona paketlenerek dengeleme tamponu ile 48 saat süreyle dengelendi. Hazırlanan hemolizat kolona tatbik edildi. Hemolizat kolondan geçtikten sonra yarım saat bekletildi. Sonra 25 ml dengeleme tamponu ile ve yıkama tamponu ile kolon yıkandı. En son elüsyon tamponu geçirilerek 2'şer ml'ler halinde fraksiyonlar toplandı. Bütün fraksiyonların, 6PGD aktivitelerinin tayinleri yapıldı. Protein miktarı ve 6PGD aktivitesi belirlenerek, saflaştırma oranı hesaplandı.

Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü

Elektroforez çalışmalarında, tarafından tanımlanan %3 kesikli sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) uygulandı. Buna göre Jel çözeltisine %10 SDS ilave edildi. Jel, 30 dakika boyunca (%50 propanol +% 10 TCA +% 40 distile su) ihtiva eden çözeltide stabilize edildi. 1/1 oranında enzim çözeltisi, SDS ile muamele edilerek 20 µg olacak şekilde tarak boşluğuna enjekte edildi. Marker olarak ise Page Ruler™ Protein Ladder,

Fermentas; 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60 kDa kullanıldı. Örneklerin yürütülmesi için elektroforez işlemi başlatıldı. Tankın kapağı kapatılarak, üstte katot (-) altta anot (+) olacak şekilde güç kaynağına bağlandı. Önce 80 voltta yarım saat ve daha 150 voltta 4-5 saat boyunca numunenin hızlı koşması sağlandı. Elektroforez tankından çıkarılan jel (%50 metanol + % 10 asetik asit içinde % 0.1 Coomassie Brilliant Blue R-250 solüsyonunda) yaklaşık 2 saat boyunca boyandı. Sonra yıkama işlemi protein bantları berrak olana kadar (% 50 metanol +% 10 asetik asit +% 40 distile su) solüsyonu içinde gerçekleştirildi (11,12).

Protein Tayini

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltilerdeki protein miktarı tayinleri bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem; fosforik asitli ortamda proteinlerin coomassie brilliant-blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması, oluşan kompleksin 595 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır. Bu yöntemin diğer protein tayin yöntemlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin pek söz konusu olmaması, protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (13,14).

6PGD Enziminin Aktivite Tayini

Aktivite ölçüm çalışmalarında, reaksiyon sonucu oluşan NADPH göz önüne alınır. 340 nm'de NADPH maksimum absorbans verdiği için enzimin aktivitesi, bu dalga boyunda ve 25°C'de NADP⁺'nin indirgenmesi sonucu oluşan NADPH'ın spektrofotometrik metotla absorpsiyon artışı sonucu ölçüldüğü ifade edilmektedir (9,15).

Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzim aktivitesine etki eden faktörlerden biri sıcaklık parametresidir. Enzimin aktivitesinin en fazla olduğu sıcaklığa "optimum sıcaklık" denir. Optimum sıcaklık inkübasyon süresine çok bağlıdır. İnkübasyon süresi ne kadar uzatılırsa optimum sıcaklıkta aynı şekilde düşer. Optimum sıcaklık tayini

için 20-70°C arasında, sabit pH (7.5)'da 0.1 mM Tris-HCl tamponu kullanılarak 10 dakika inkübatörde bekletilerek aktivite tayinleri yapıldı (16).

Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Bir enzimin reaksiyonu en fazla hızlandığı pH'ya "optimum pH" denir ve pH enzim üzerindeki iyonize olabilen grupların yüklerini değiştirerek enzim aktivitesini etkiler. Optimum pH dışında hız azalır ve belirli bir pH'da enzim tamamen inaktif hale gelir ki bu pH'ya "izoelektrik pH" denir. 0.1 mM Tris-HCl+0.5 mM EDTA tamponunun pH'sı 4 ile 12 arasında değiştirilerek sabit sıcaklıkta (25°C) aktivite tayinleri yapıldı (11).

Enzim *in vitro* İlaç Çalışmaları

Çalışmalarda en uygun beş farklı substrat konsantrasyonu, substrat stok çözeltileri kullanılarak ön denemelerle belirlendi. Yine aynı şekilde her bir substrat konsantrasyonu için en uygun 3 sabit inhibitör konsantrasyonu inhibitör stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla tespit edildi. Daha sonra Van Kedisi eritrositinden saflaştırılan 6PGD enzimi için üç farklı inhibitör konsantrasyonunda V-[S] değerleri belirlenerek her bir inhibitör için ayrı ayrı Lineveawer-Burk grafikleri çizilerek Ki değerleri belirlendi (17).

Tablo 1. Van Kedisi 6PGD enziminin saflaştırılması sonuçları.

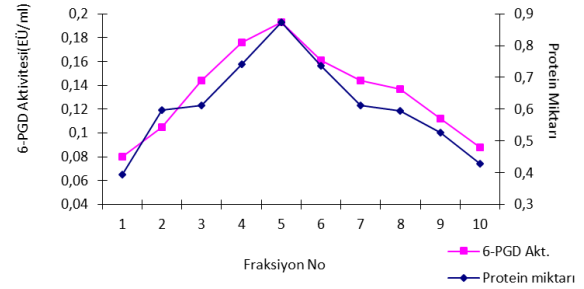
Table 1. Purification results of Van Cat erythrocytes G6PG enzyme.

Saflaştırma Basamakları	Toplam Hacim (ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EÜ)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Hemolizat	100	1861.5	4.03	1.125	100	1
2'5'-ADP Sepharose 4B	10	0.5	1.93	3.86	48	1787

Değişik sıcaklıklarda gerçekleştirilen aktivite tayin çalışmaları Tablo 2'de verilmiştir. Buna göre enzimin

BULGULAR

Van Kedisi eritrositinden 6PGD enzimi 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite jel kromatografisi ile saflaştırıldı. Enzim aktivitesi tayini yapıldı. Enzim 1787 kat saflaştırıldı. Spesifik aktivite 3.86 U/mg olarak bulundu ve enzim %48 saflaştırılmış oldu. Sonuçlar ise Şekil 1'de gösterildi.



Şekil 1. Van Kedisi eritrosit 6PGD enziminin saflaştırma grafiği.

Figure 1. Purification graph of Van Cat erythrocytes 6PGD enzyme.

Numuneye ait protein ve aktivite değerleri hesaplanarak saflaştırma tablosu ise Tablo 1'de verilmiştir.

aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklık 50°C olarak belirlendi.

Tablo 2. Enzim aktivitesinde sıcaklık etkisi.**Table 2.** Effect of temperature on the enzyme activity.

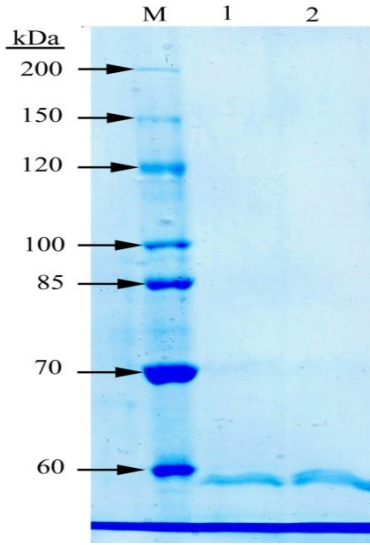
(°C)	20	25	30	35	40	45	50	55	60	70
%Ak	16.6	27.7	44.4	55.5	61.1	66.6	100	70	55.5	5.5

Enzimin pH değişimine karşı gösterdiği davranışlardan elde edilen sonuçlar Tablo 3'de bir

araya getirilmiştir. Enzim aktivitesi, birkaç pH değerinde ölçüldüğü zaman optimum pH 8.0 olarak gözlenmiştir.

Tablo 3. Enzim aktivitesinde pH etkisi.**Table 3.** Effect of pH on the enzyme activity.

pH	4.5	5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	9	9.5	10	11
%Ak	0	18.1	27.2	36.3	45.4	81.8	100	90.9	72.7	63.6	54.5	0

**Şekil 2.** Enzimin SDS-PAGE bantları (Marker (M): Page Ruler™ Protein Ladder, Fermentas; 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60 kDa).**Figure 2.** SDS-PAGE bands of enzyme (Marker (M): Page Ruler™ Protein Ladder, Fermentas; 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60 kDa).

Her bir proteinin oluşturulan standart grafikten saflaştırılan 6PGD enziminin molekül ağırlığı 52602 Da olarak bulundu. Şekil 2 elektroforez sonuç fotoğrafında kullanılan protein molekül ağırlıkları Marker (M), 1 ve 2 numaralı kuyucuklarda ise saflaştırılan 6PGD enziminin SDS-PAGE bantları bulunmaktadır.

Değişik ilaçların I_{50} ve K_i değerleri belirlenirken; uygun seyreltilmiş enzim üzerine değişik ilaçlardan 5 farklı konsantrasyonda ilave edildi. İlave edilen inhibitör sonrası enzim aktiviteleri hesaplandı. % Aktivite-[I] grafikleri çizildi. Bu grafiklerden her bir ilacın I_{50} değerleri hesaplandı. Bu ilaçların K_i değerleri ise; kinetik çalışmanın bu aşamasında her bir ilaç için inhibitörün 5 farklı konsantrasyonunda çalışıldı. Sonuçlar Lineweaver-Burk grafiğine dönüştürüldü. Grafikten inhibisyon türü belirlendi ve ilgili formül kullanılarak K_i değerleri hesaplandı ve Tablo 4'de verildi.

Tablo 4. Van Kedisi eritrosit 6PGD enzimi için Ki değerleri ve inhibisyon tipleri.**Table 4.** The Ki values and inhibition types for of Van Cat erythrocyte 6PGD.

Inhibitor	[I]	Ki	Medium Ki Values	Inhibition Type
Netilmicin sülfat	3x10 ⁻³ M	0.39 mM	3.9x10 ⁻¹ mM	Noncompetitive
	6x10 ⁻³ M	0.35 mM		
	9x10 ⁻³ M	0.43 mM		
	20x10 ⁻³ M	0.16 mM		
Ampicillin	25x10 ⁻³ M	0.15 mM	1.5x10 ¹ mM	Noncompetitive
	35x10 ⁻³ M	0.14 mM		
	20x10 ⁻³ M	0.3 mM		
	30x10 ⁻³ M	0.45 mM		
Amoxicillin	30x10 ⁻³ M	0.45 mM	5x10 ⁻¹ mM	Competitive
	40x10 ⁻³ M	0.75 mM		

TARTIŞMA ve SONUÇ

Biyokimyasal reaksiyonları katalizleme görevini yerine getiren enzimlerin saflaştırılması ve nitelendirilmesi diğer çalışmalar için bir ön basamak niteliği taşımaktadır. Bu nedenle belirli kriterlere göre saflaştırma stratejisi belirlenmelidir. Temel kriter en düşük maliyetle, en yüksek saflık ve enzim aktivitesi elde etmektir. Bunlara göre de diğer basamaklar düzenlenir.

Yapılan çalışma sonucu Van Kedisi eritrositinden saflaştırılan 6PGD enziminin saflaştırma oranı 1787 kat olarak belirlendi. Beydemir ve ark. (11) tarafından yapılan çalışmada ise 2'-5' ADP Sepharose-4B dolgu maddesini kullanılarak afinite kromatografisi ile rat eritrositinden saflaştırma oranı 2575 kat'lık bir saflaştırma gerçekleştirmiştir. Başka bir çalışmada da insan beyninden saflaştırılmasında bu oran 400 kat bulunmuştur (18). Demir ve ark. (19) tarafından yapılan bir diğer çalışma maydanoz yapraklarından DEAE-Sephadex A50 iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılmasında ki oran 339 kat bulunmuştur. Ayrıca yapılan diğer bir çalışmada ıspanak yapraklarından saflaştırılan 6PGD'nin saflaştırma oranı ise 1000 kat olarak bulunmuştur (20).

Elektroforez çalışmalarından elde edilen protein bandı bir monomeri gösterdiğinden koyun kaynaklı 6PGD enziminin elde edilen ağırlık değeri bir tek monomerin ağırlığıdır. Ceyhan ve ark. (21) tarafından

yapılan bir çalışmada 52 kDa, Ohara ve ark.(22) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise 32.8 kDa olarak bulunmuştur. 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz enziminin molekül ağırlığı, standart karışımındaki son 3 proteinin standart değerlerine göre 52602 Da olarak bulunmuştur. Bulunan bu miktar ise literatürlerle uyum halinde olduğu görülmektedir.

6PGD enziminin aktivite tayini yapıldı (9). Bu yöntemle prensip olarak reaksiyon ortamında 6-Fosfoglukonat'ın, D-Ribuloz-5-Fosfat'a dönüşümü esnasında oluşan NADPH'nin 340 nm'de spektrofotometrik olarak verdiği absorbans farkının ölçümüne dayanır. Birim zamanda NADPH'a dönüşen NADP⁺ miktarı hesaplanarak, 6PGD enziminin spesifik aktivitesi 3.86 EU/mg protein olarak belirlendi. Kinetik çalışmalar da 25°C ölçümleri gerçekleştirildiği halde, optimum sıcaklığın belirlenmesi için yapılan çalışmalarda, optimum sıcaklık 50°C olarak belirlenmiştir. Bu farkın materyalden kaynaklandığı düşüncesindeyiz. Çünkü, Beydemir ve ark. (11) rat eritrositinde yaptıkları çalışmada optimum sıcaklığın 45°C olduğunu rapor etmektedirler. Yine bu sıcaklık, Demir ve ark. (16) tarafından maydanoz yapraklarıyla yapılan çalışmada ise 50°C, Erat (23) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise optimum sıcaklığın 60°C olduğu belirtilmektedir.

Optimum pH'nın belirlenmesi için yapılan deneylerde, optimum pH değeri 8.0 olarak belirlenmiştir. Beydemir ve ark. (11) rat eritrositinde

yaptıkları çalışmada optimum pH'yı 7.0, Demir ve ark. (19) maydanoz yapraklarıyla çalıştıklarında ise optimum pH'yı 8.0 olarak saptamışlardır. Bu çalışmamızın sonuçları diğer çalışmalarla büyük bir uyum içinde olduğu görülmüştür.

Saflaştırılan 6PGD enzimine inhibitörlerin etkisini araştırmak amacıyla piyasada yaygın olarak kullanılan 3 antibiyotik tercih edildi. Bu antibiyotikler Netilmicin sülfat, Ampicillin ve Amoxicillin'dir. Bunların I_{50} değerleri ise sırasıyla; 5.13 mM, 24.66 mM ve 15.57 mM'dir. K_i değerleri ise sırasıyla; $3.66 \times 10^{-2} \text{ mol}^{-1} \text{ dak}^{-1}$, $1.4 \times 10^{-2} \text{ mol}^{-1} \text{ dak}^{-1}$ ve $4.5 \times 10^{-2} \text{ mol}^{-1} \text{ dak}^{-1}$ olarak belirlendi. Genellikle ilaçların inhibisyon etkileri I_{50} değeri olarak literatürlerde verilir. 6PGD enzimi için literatürlerde birçok kinetik çalışma mevcuttur. Örneğin tavuk karaciğerinde yapılan bir çalışmada NADP^+ için I_{50} değeri, 2.751 mM olduğu tespit edilmiştir (24). Rat eritrositinde kullanılan ilaçlarda I_{50} değerleri, Cefepime için 4.213 mM, Penicilin G için 161.162 mM, Gentamicin sülfat için ise 4.932 mM olduğu bulunmuştur (15).

Buna göre çalışmamızda kullanılan ilaçların 6PGD enzimi üzerindeki inhibisyon etkilerinin I_{50} değerlerine göre büyükten küçüğe doğru sıralanışı; Netilmicin sülfat, Ampicillin ve Amoxicillin şeklindedir.

Bulunan sonuçlara göre kullanılan ilaçlar uygulanmadan önce 6PGD eksikliğinin olup olmadığı araştırılması gerekmektedir. Özellikle 6PGD eksikliğinde bu ilaçların kontrolsüz kullanımı tehlikeli olabilir. Ayrıca enzimi inhibe eden bu ilaçlar başka enzimlere de etki edebileceğide düşünülmelidir.

KAYNAKLAR

- Toews ML., Kanji M., Carper W., 1976. 6-phosphogluconate dehydrogenase. The J of Biolog Chem, 251, 7127-7131.
- Tandoğan B., Ulusu NN., 2003. 6-fosfoglukonat dehidrogenaz: Moleküler ve kinetik özellikleri. Türk Biyo Dergisi, 28, 268-273.
- Caprari P., Caforio MP., Cianciulli P., Maffi D., Pasquino MT., Tarzia A., Amadori S., Salvati AM., 2001. 6-Phosphogluconate dehydrogenase deficiency in an Italian family. Annals of Hemato, 80, 41-44.
- Corrons V., Colomer D., Pujades A., Rovira A., Aymerich M., Merino A., 1996. Congenital 6-phosphogluconate dehydrogenase deficiency Associated with chronic hemolytic anemia in a Spanish family. American J of Hemato, 53, 221-227.
- Walzem RL., Storebakken T., Hung SSO., Hansen RJ., 1991. Relationship between growth and selected liver enzyme activities of individual rainbow trout. J of Nutrition, 121, 1090-1098.
- Barrett P., 1997. The pentose phosphate pathway and parasitic protozoa. Parasitol Today, 13 (1), 11-16.
- Keha EE., Küfrevioğlu Ö., 2000. Biyokimya. 344-345, Aktif Yayınevi, Ankara.
- Gözükara E., 1989. Enzimler. "Biyokimya", 572-576, Ofset Repromat Ltd. Şti., Ankara.
- Beutler E., 1971. Redcell metabolism. "Manual of biochemical methods", 12, 68-70, Academic press, London.
- Gür F., Beydemir Ş., Gümüştekin K., Bakan N., 2014. Ketoprofenin 6-fosfoglukonat dehidrogenaz aktivitesi üzerine in vitro ve in vivo etkisinin araştırılması. Atatürk Üni Vet Bil Derg, 9, 173-179.
- Beydemir Ş., Çiftçi M., Yılmaz H., Küfrevioğlu OI., 2004. 6-phosphogluconate dehydrogenase: Purification, characterization and kinetic properties from Rat erythrocytes. Turk J of Vet Ani Sci, 28, 707-714.
- Laemmli DK., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-683.
- Bradford MM., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analy Biochem, 7, 248-254.
- Özabacıgil F., 2005. İnsan eritrosit 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin saflaştırılması, bazı ilaçların enzim aktivitesi üzerine in vitro ve tavşanlarda in vivo etkisinin

- incelenmesi. Atatürk Üni, Sağ Bil Ens, Erzurum, Türkiye.
15. Akyüz M., Erat M., Çiftçi M., Gümüştekin K., Bakan N., 2004. Effects of some antibiotics on human erythrocyte 6-Phospho Gluconate Dehydrogenase: An in vitro and in Vivo study. J of Enzyme Inhi and Medicinal Chem, 19, 361-365.
 16. Adem Ş., Çiftçi M., 2007. Effects of some drugs on human erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase: an in vitro study. J of Enzyme Inhi and Med Chem, 22, 751-754.
 17. Ciftci M., Beydemir S., Yılmaz H., Bakan E., 2002. Effects of some drugs on rat erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase: An in vitro and in vivo study. J Pharma, 54:275-280.
 18. Weisz KS., Schofield PJ., Edwards MR., 1985. Human brain 6-PGD: Purification and kinetic properties. J of Neurochem, 44, 510-517.
 19. Demir H., Çiftçi M., Küfrevioğlu Öi., 2003. Purification of 6-phosphogluconate dehydrogenase from Parsley (Petroselinum hortense) leaves and investigation of some kinetic properties. Prep Biochemhem and Biotech ,33, 39-52.
 20. Krepinsky K., Plaumann M., Martin W., Schnarrenberger C., 2001. Purification and cloning of chloroplast 6-PGD from spinach. Euro J of Biochem, 268, 2678-2686.
 21. Ceyhan D., Danısan A., Oğu, IH., Ozer N., 2005. Purification and kinetic properties of 6-phosphogluconate dehydrogenase from rat small intestine. The Protein J, 24, 293-301.
 22. Ohara H., Russell RA., Uchide K., Kondo H., 2004. Purification and characterization of NAD specific 6-phosphogluconate dehydrogenase from Leuconostoc lactis SHO-54. J of Biosci and Bioengin, 98, 126-128.
 23. Erat M., 2005. Purification of 6-phosphogluconate dehydrogenase from chicken liver and investigation of same kinetic properties. Prep Biochemhem and Biotechno, 35, 53-69.



Atresia Ani, Hypospadias and Rudimentary External Genitalia in Two German Holstein Calves

Zafer USTA¹, Ottmar DISTL¹

1. University of Veterinary Medicine Hannover, Institute for Animal Breeding and Genetics, Hannover, GERMANY.

Geliş Tarihi/Received
06.10.2016

Kabul Tarihi/Accepted
27.01.2017

Yayın Tarihi/Published
30.10.2017

Abstract: In the present report, clinical, pathological, and cytogenetic examinations of a one-day-old male German Holstein calf with atresia ani, hypospadias and rudimentary external genitalia (HYP-AA) and a six-months-old male German Holstein calf with hypospadias and rudimentary external genitalia (HYP) are presented. In the first case (HYP-AA), an anal orifice was missing. The urethra opened in the perineum. Consequently, the inguinal region was infiltrated with urine. A secondary finding was a vesicle at the anal area with a diameter of approximately 10 cm. Histopathological examination of the anal area of the HYP-AA-calf showed a necrotizing dermatitis with multifocal acute bleedings and diffuse oedema. In addition, an interstitial pneumonia and urethritis were identified. In the clinical examination of the second case (HYP), a penile and preputial aplasia, an incomplete ventral covering by skin and a bifid scrotum were found. Histopathological examination of the HYP-calf revealed a urethritis with epithelial hyperplasia in the urethra and a follicular hyperplasia of the lymph nodes. The HYP-calf had normally developed testicles. However, there was no active spermatogenesis. The inbreeding coefficient for the HYP-AA-calf was 0.684% and for the HYP-calf 5.273% and both affected calves had one ancestor in common, a Holstein bull used in artificial insemination. In conclusion the congenital anomalies of the two cases might be due to mutations transmitted by the common ancestor.

Keywords: Atresia ani, Congenital anomaly, Hereditary, Hypospadias, Rudimentary external genitalia.

İki Alman Holştayn Buzağında Atresia Ani, Hypospadias ve Gelişmemiş Dış Genital Organlar Olgusu

Öz: Bu raporda, klinik, patolojik ve sitogenetik muayenelerinin yapıldığı Atreziya ani, hypospadias ve gelişmemiş dış genital organlar ile karakterize bir günlük erkek Alman Holştayn buzağı (HYP-AA) ile Hypospadias ve rudimenter dış genital organlar ile karakterize altı aylık erkek bir Alman Holştayn buzağı (HYP) sunulmuştur. İlk olguda (HYP-AA) anüs oluşmamıştı. İdrar yolu perineuma açılmıştı; bunun sonucu olarak, kasık bölgesinden idrar süzülüyordu. İkinci bulgu olarak, yaklaşık 10 cm'lik bir çapa sahip olan anal bölgede bir vezikül oluşumu vardı. HYP-AA'nın anal bölgesinde yapılan histopatolojik incelemede multifokal akut kanama ve yaygın ödemli nekrotizan dermatit odaklar görüldü. Klinik olarak, interstisyel pnömoni ve üretrit tespit edilmiştir. İkinci olguda ise (HYP), bir penil ve prepusyal aplazi, ventral tarafı deri tarafından kaplanmamış bifid skrotum olgusu görüldü. HYP-nin histopatolojik incelemesinde üretra epitelinde hiperplazi ve lenf nodularında foliküler hiperplazi ve üretrit gözlemlendi. HYP-nin testisi normal gelişmiş, ancak aktif spermatogenez görülmedi. HYP-AA için akrabalık katsayısı % 0.684 ve HYP-için % 5.273 ve her iki buzağının babaları ortakdı. Sonuç olarak iki olguda da meydana gelen konjenital anomaliler ortak boğa tarafından iletilen mutasyonlara bağlı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Atreziya ani, Hypospadias, Kalıtsal, Konjenital anomaly, Rudimenter dış genital organlar.

INTRODUCTION

Congenital defects are structural or/and functional abnormalities that are present at birth. The frequency of congenital defects in cattle was estimated to be at 0.25% (1). Rectal anomalies have been reported in cattle as the most frequent inborn anomalies of the gastrointestinal system (2). Atresia of the intestine can be localized in the ileum, colon, rectum, or anus (3-5). Atresia ani is characterized by perineal bulging and absence of an anal opening. This anomaly is a common birth defect in cattle and is often accompanied by other congenital defects of the digestive, urogenital tract (6-9) or other organs (4,5). Based on varying degrees of dysgenesis or agenesis of the rectum and anus, atresia ani in cattle can be categorized into four types (9). Type 1 involves the development of a relatively normal rectum and a patent but stenotic anus. Type 2, or imperforate anus, is characterized as a rectum that ends in a blind pouch without development of an anus. In most cases the rectum is properly formed but the anus is covered by a thin membrane of skin. Type 3 is characterized by formation of a blind pouch in the proximal rectum and absence of an anus. Type 4 is described by the formation of a blind pouch in

the proximal rectum and a normally developed anus. Intestinal atresia has been reported for various cattle breeds such as Holstein, Ayrshire, Charolais, Swedish Highland, Jersey, Maine Anjou, and Shorthorn breeds (3,7,10-13). The pattern of inheritance in cattle is still unclear (3,7). Congenital anomalies of the urinary system are rarely observed in cattle even, so a wide variety of malformations could be encountered (1). Hypospadias is an imperfect closure of the external male urethra (14) with dribbling of urine in the inguinal region. This abnormality can be observed as a glandular, penile, scrotal, and perineal imperfect closure of the urethra (14,15). Hypospadias is the second most common congenital abnormality of the urogenital system after cryptorchism in humans (16) but appears rarely in animals (15,17). Further defects associated with hypospadias are cryptorchism, atresia ani, bifid scrotum, penile aplasia and omphalophlebitis (Table 1). Herzog (14) suggested multifactorial genetic, endocrinological and environmental factors to cause this malformation. In a study on rats, Uda et al. (18) assumed defects in androgen metabolism and/or androgen receptors which may lead to this congenital deformity.

Table 1: Review of single cases of *hypospadias* in cattle.

Tablo 1. Sığırlarda tekli hypospadias vakalarının literatür taraması.

Reference	Breed/sex	Age	Type	Urogenital anomaly	Other anomalies
Alam et al. 2005	Korean/m	2-3 weeks	scrotal	<i>penile aplasia, unilateral cryptorchism</i>	none
	Korean/m	2-3 weeks	perineal	<i>penile aplasia, unilateral cryptorchism</i>	none
	Korean/m	2-3 weeks	perineal	<i>penile aplasia, unilateral cryptorchism</i>	none
Torres et al. 2013	Nelore/m	1 days	scrotal, anal, perineal	<i>bifid scrotum</i>	<i>atresia ani and recti, omphalophlebitis</i>
Pamuk et al. 2010	Simmental/m	1 days	perineal	<i>penile and preputial aplasia, rudimentary left kidney and left urethral anomaly</i>	none
Abd-El Hady and El-Din 2014	crossbreed/f	5 months	penile	<i>penile and preputial hypoplasia</i>	none
Kumi-Diaka and Osori 1979	Bunaji/m	1 day	scrotal	<i>bifid scrotum, preputial aplasia</i>	<i>atresia ani</i>
	Bunaji/m	1 day			<i>atresia ani, imperforated left ear</i>

The objective of the present report was to describe a case of hypospadias in a six months old male German Holstein calf and a case of atresia ani and hypospadias in a one-day old male German Holstein calf associated with rudimentary external genitalia using clinical, histological, pathological, and cytogenetic examinations as well as pedigree analyses.

CASE REPORT

Case History

A case of atresia ani (HYP-AA) and a case of hypospadias (HYP) were notified in Holstein calves on dairy farms. The male HYP-AA affected calf was born after full term gestation in July 2009 (Figure 1A). At the age of one day, the HYP-AA-affected calf and at the age of six months the HYP-affected calf were transferred to the Institute for Animal Breeding and Genetics, University of Veterinary Medicine Hannover (Figure 2A). The dam of the HYP-affected calf gave birth to one healthy calf before. Both farms

were free of bovine viral diarrhoea (BVD) virus and bovine herpes virus type 1 (BHV1).

Clinical Signs

The present HYP-AA-case had no anal opening (Figure 1A). There was a long subcutaneous skin groove extending from the perineal region towards the penis and rudimentary external genitalia (Figure 1B, 1C). The behaviour of the affected calf was very calm. The rectal temperature was markedly lowered (35.4°C). Furthermore, bradycardia (76/min) and hypopnea (15/min) were observed. The calf died a few minutes after clinical examination.

The HYP-case skinned an opening of the urethra in the perineal region below the anus. The animal was at good health. The animal showed an internal body temperature of 38.5°C, a heart rate of 80 beats per minute and a normal respiration rate of 25 per minute. After six month the calf was slaughtered at a weight of 150 kg.



Figure 1. **A:** Holstein calf affected by *atresia ani* and *hypospadias*(HYP-AA). **B:** Type 2 *atresia ani* with a missing anal orifice. **C:** *Hypospadias* (a), *penile* and *preputial aplasia* (b). **D:** Preparation of the testicles, urinary tract and bladder.

Şekil 1. **A:** Atrezia ani ve Hyospadidan etkilenmiş Holştayn buzağı (HYP-AA). **B:** Anal deliği oluşmamış Tip 2 atrezia ani. **C:** Hyospadia (a), penil ve prepusyal aplazi (b). **D:** Testisler, idrar yolları ve mesane görünümü.



Figure 2. A: Holstein calf affected by *hypospadias* (HYP). B: Ventral area of the *urethra* of the present case with the perineal area (1), scrotal area (2) and penile area (3). C: *Penile and preputial aplasia* (1).

Şekil 2. A: Hypospadiadan etkilenmiş Holştayn buzağı (HYP). B: Olgunun üretrasının ventral alanının perineal (1), skrotal (2) ve penil (3) bölgesi. C: Penil ve prepusyal aplazi (1).

Necropsy Findings

The anal subcutaneous skin of the HYP-AA-affected calf showed a severe purulent necrotizing, focal dermatitis and a diffuse oedema (Figure 1B). The penis was located 3 cm cranial to the genital region (Figure 1C). In this area there were 3 ducts. The medium duct ended at a diameter of about 3 cm and was in the digestive diverticulum, which showed

multiple, subepithelial, petechial haemorrhages. The second duct ended anterior to the anal region in a skin opening, which was approximately 10 cm long and presented as a diffuse drain channel in the skin. At the end of the drain channel skin flaps of approximately 3 cm were in a rudimentary trained prepuce. The third duct was surrounded by connective tissue and could be traced to the preputial area. The atresia was approximately 10 cm

cranial to the anus and showed an engorgement of meconium in the descending colon and rectum. The cecum showed a clockwise torsion by 180° with prominent haemorrhagic infarction of the mucosa

(Figure 3A). In the lungs of the present case a low acute diffuse congestion hyperaemia was observed. Furthermore, a little to medium grade pneumonia was detected (Figure 3B).

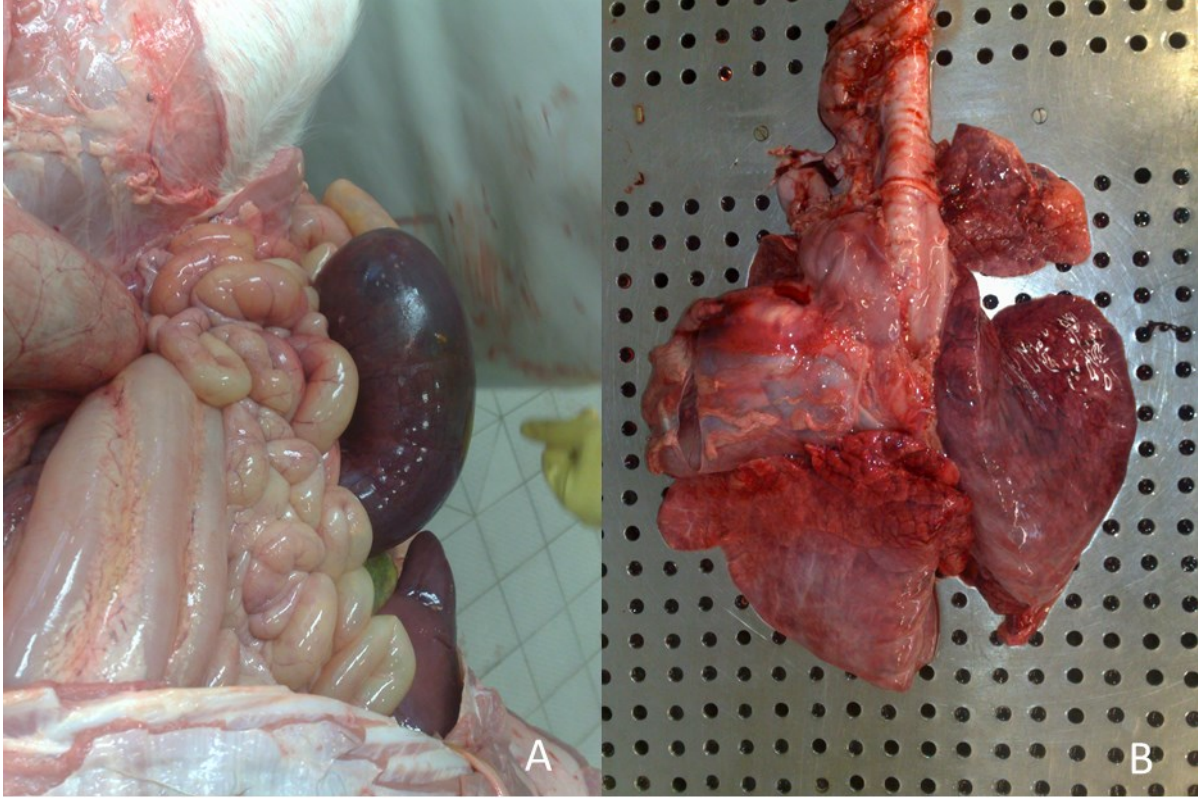


Figure 3. Necropsy of the Holstein calf affected by *atresia ani* and *hypospadias* (HYP-AA). **A:** Clockwise torsion of the *cecum* by 180° with prominent haemorrhagic infarction of the mucosa. **B:** Congestion hyperaemia and alveolar and interstitial pneumonia and oedema in the lungs of the present case.

Şekil 3. Atrezia ani ve hyospadidan etkilenmiş Holştayn buzağının nekropsisi (HYP-AA). **A:** Mukozanın belirgin hemorajik enfarktüsü ile karakterize *cecum*'un saat yönünde 180 ° dönmesi. **B:** Mevcut olgunun akciğerlerinde hiperemik bir görüntü ile alveolar ve interstisyel pnömoni ve ödem oluşumu.

Histopathological Findings

After necropsy of both calves, tissue samples were fixed in 10% buffered formalin, dehydrated in alcohol series, and embedded in paraffin paraplast mixture for histopathological analysis. The paraffin block sections (2-3µm) were prepared using a rotary microtome with integrated Super frost/Plus slides and stained mechanically in a colour machine (Leica ST 4040, Nussloch) with Hematoxylin-Eosin (HE). The tissue of the anal area showed a severe, necrotizing dermatitis with multifocal acute bleeding and a diffuse oedema. In the umbilical artery a severe, fibrino-purulent periarterial inflammation was

observed. The lungs showed a medium-grade alveolar oedema, a low-grade interstitial oedema and a mild, multifocal, interstitial pneumonia. In the urethral diverticulum the transitional epithelium of the lamina propria was oedematous. The urethra showed a purulent urethritis with a severe, ulcerative dermatitis and development of granulation tissue. The urogenital tract of the HYP-affected calf endeavoured a histopathological examination. The closed part of the urethra showed a moderate multifocal lymphohistiocytic urethritis. At the transition of the closed to the open part of the urethra cutaneous mucosa was observed. On the open part of the urethra, a moderate epithelial

hyperplasia was detected. The testicles were normally developed. However, there was no active spermatogenesis. The regional lymph nodes showed a low-grade follicular hyperplasia.

Virological Findings

The blood samples were tested for bovine viral diarrhea (BVD) virus antigen (Ag) by ELISA (cooker check BVD Ag/Serum Plus, IDEX Laboratories) and for BVD virus antibody (Ab) (cooker check BVDV Ak, IDEX Laboratories) at the Institute for Virology. The virological results of the present cases were negative for bovine herpesvirus 1 (BHV-1), bovine viral diarrhea (BVD) virus, bluetongue virus 8 and parainfluenza virus 3.

Pedigree Analysis

The six prior generation pedigree data of the calves were analysed using the program Opti-Mate,

version 3.81 (19). The dam of the HYP-AA-calf gave birth to eight healthy calves before. There were no cases of atresia ani or hypospadias before in this herd. All heifers and cows had been bred by artificial insemination (AI). The sire of the HYP-AA-calf was an Austrian Red Holstein AI-bull. The inbreeding coefficient for the AA-calf was 0.684% due to a common ancestor on the maternal and paternal side. The dam of the HYP-calf gave birth to one healthy calf before. The farm had no cases of hypospadias or other anomalies before. The inbreeding coefficient for the HYP-calf was 5.273% due to a common ancestor on the maternal and paternal side. Using pedigree records, we traced the on the paternal side two affected calves to one common ancestor, a common Holstein AI-bull. The sires of both affected calves had this Holstein bull as common paternal grandsire (Figure 4).

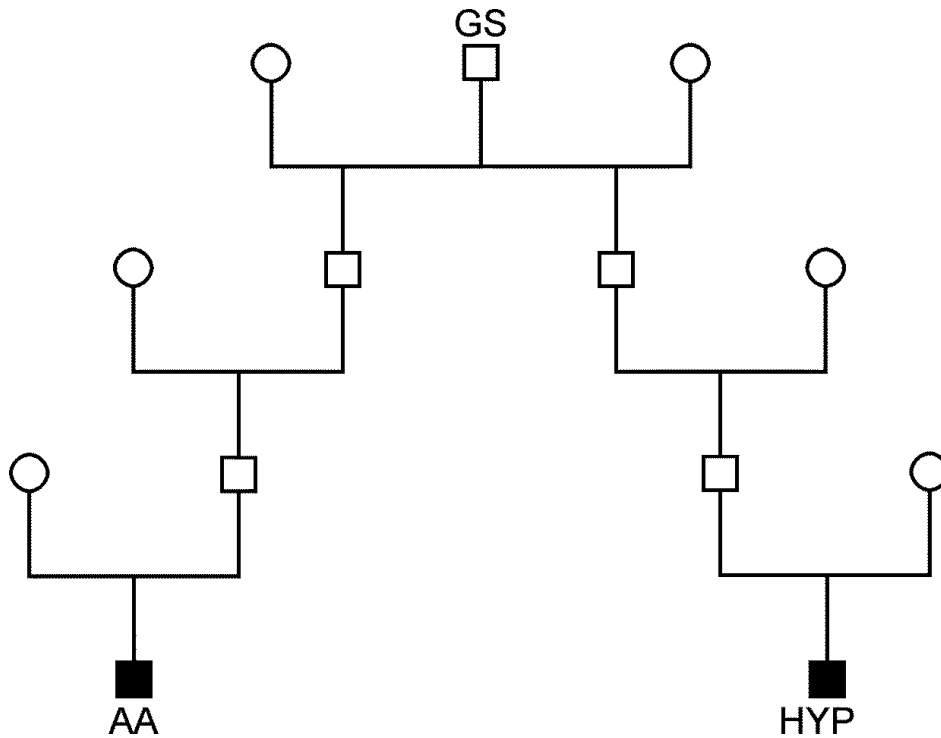


Figure 4. Pedigree of the calves affected by atresia ani and hypospadias(AA) and affected by hypospadias (HYP). GS=Grandsire

Şekil 4. Atreziya ani ve hypospadias (AA) 'dan etkilenen ve hipospadiya (HYP) 'dan etkilenen buzağuların pedigrisi. GS = Büyükata

Chromosomal findings

Cytogenetic analysis was performed by standard methods from blood lymphocytes. Metaphase spreads were prepared from fibroblast cultures, G banded, and Giemsa stained. The arrangement of the chromosomes in the karyotype corresponds to the international nomenclature (International System for Chromosome Nomenclature of Domestic Bovids, 2000). The cytogenetic results of both calves revealed no discernible difference in the number of chromosomes. The calves showed normal karyotypes of male cattle with $2n=60,XY$.

DISCUSSION and CONCLUSION

The inborn anomalies the two calves had in common were hypospadias, a rudimentary penis and a rudimentary preputium as well. Both calves could be traced back to a common ancestor, a Holstein bull used in artificial insemination (AI).

The hypospadias of both affected calves could be classified as penile, scrotal, and perineal form due to its extension. Hypospadias appears most often in dogs, goats, and sheep. In contrast, in cattle hypospadias occurs only infrequently (0.46%) (20). In men, mutations in the genes HOX, FGF, WT1, MAMLD1, SRD5A2 and AR seem to be associated with hypospadias (21). In cattle, a recessive mode of inheritance had been assumed (14).

The common Holstein AI-bull used in artificial breeding may be associated with the development of the condition of hypospadias. The formation of urogenital anomalies was reported to be caused by chromosomal anomalies (22). In contrast to the results of Rousseaux and Ribble (22), the calves of the present report showed normal male karyotypes of $2n=60,XY$.

Congenital anomalies have been rarely described after in vitro-production (IVP) of embryos in cattle. In a study on more than 2000 calves, King et al. (23) found two calves with kidney failure, hydrocephalus, abnormal hearts, and cerebellar aplasia. In the HYP-AA-affected calf from IVP, atresia ani with hypospadias and rudimentary genital organs were diagnosed. Other authors described the

presence of atresia ani and an underdeveloped preputium and scrotum in calves born after cloning (24,25).

Based on the scheme according to Loynachan et al. (9), type 2 atresia ani was diagnosed in the HYP-AA-case. Clinical signs of atresia ani seen in the HYP-AA-affected calf including anorexia, abdominal distension, decreased suckle reflex (3,26) and no passing of meconium or faeces were consistent with previous reports. The most frequently encountered urogenital abnormalities in calves are hypospadias, hermaphroditism and penile agenesis (7-9). Hypospadias is a congenital defect of the urethra that involves an abnormally positioned urinary meatus. Dependent on the anatomical localization of the urethral opening this condition is classified as anal, perineal, scrotal, or penile hypospadias. In men, hypospadias is usually of the penile type, whereas in cattle the perineal and scrotal hypospadias occur most frequently.

The reports on hypospadias or atresia ani in cattle are most often dealing surgical treatment. This is the first study in cattle on two inbred cases with hypospadias and related through a common ancestor used in AI. Therefore, hereditary factors may be involved in hypospadias.

REFERENCES

1. Leipold HW., Huston K., Dennis SM., 1983. Bovine congenital defects. *Adv Vet Sci Comp Med*, 27, 197-271.
2. Aslan L., Karasu A., Gencelep M., Bakir B., Alkan I., 2009. Evaluation of cases with congenital anorectal anomalies in ruminants. *YYU Vet Fak Derg*, 20, 31-36.
3. Kilic N., Sarierler M., 2004. Congenital intestinal atresia in calves: 61 cases (1999-2003). *Rev Med Vet-Toulouse*, 155, 381-384.
4. Payan-Carreira R., Pires MA., Queresma M., Chaves R., Adegas F., Pinto HG., Colaco B., Villar V., 2008. A complex intersex condition in a Holstein calf. *Anim Reprod Sci*, 103, 154-163.
5. Lejeune B., Miclard J., Stoffel H., Meylan M., 2011. Intestinal Atresia and Ectopia in a Bovine Fetus. *Vet Pathol*, 48/4, 830-833.

6. Kumi-Diaka J., Osori DIK., 1979. Perineal hypospadias in two related bull calves. *Theriogenology*, 11, 163-164.
7. Ghanem M., Yoshida C., Isobe N., Nakao T., Yamashiro H., Kubota H., Miyake YI., Nakada K., 2004. Atresia ani with diphallus and separate scrota in a calf: a case report. *Theriogenology*, 61, 1205-1213.
8. Ghanem ME., Yoshida C., Nishibori M., Nakao T., Yamashiro H., 2005. A case of freemartin with atresia recti and ani in Japanese Black calf. *Anim Reprod Sci*, 85, 193-199.
9. Loynachan AT., Jackson CB., Harrison LB., 2006. Complete diphallia, imperforate ani (type 2 atresia ani), and an accessory scrotum in a 5-day-old calf. *J Vet Diagn Invest*, 18, 408-412.
10. Lenghaus C., White WE., 1973. Intestinal atresia in calves. *Aust Vet J*, 49, 587-588.
11. Leipold HW., Saperstein G., Johnson DD., Dennis SM., 1976. Intestinal atresia in calves. *Vet Med Sm Anim Clin*, 74, 1037-1039.
12. Johnson R., Coy CH., Ames NK., 1983. Congenital intestinal atresia of calves. *J Am Vet Med Assoc*, 158, 2071-2072.
13. Binanti D., Prati I., Locatelli V., Pravettoni D., Sironi G., Riccaboni P., 2012. Perineal choristoma and atresia ani 2 female Holstein Friesian calves. *Vet Pathol*, 50, 156-158.
14. Herzog A., 2001. *Pareys Lexikon der Syndrome*. Parey Buchverlag, Berlin.
15. Alam MR., Shin SH., Lee HB., Choi IH., Kim NS., 2005. Hypospadias in three calves: a case report. *Vet Med Czech*, 50, 506-509.
16. Pierik FH., Burdorf A., Nijman JMR., de Munick Keizer-Schrama SMPF., Juttman RE., Weber RFA., 2002. A high hypospadias rate in the Netherlands. *Human Reproduction*, 17, 1112-1115.
17. Abd-El-Hady AAA., El-Din MMM., 2014. Hypospadias and urethral diverticulum in a female pseudohermaphrodite calf. *Sch J Agric Vet Sci*, 1, 288-292.
18. Uda A., Kojima Y., Hayashi Y., Mizuno K., Asai N., Kohri K., 2004. Morphological features of external genitalia in hypospadias rat model: 3-dimensional analysis. *J Urol*, 171, 1362-1366.
19. Wrede J., Schmidt T., 2003. Opti-Mate, Version 3.81. Ein Management-Programm zur Optimierung der Inzucht in gefährdeten Populationen. Institut für Tierzucht und Vererbungs-forschung der Stiftung Tierärztlichen Hochschule Hannover.
20. Murakami T., 2008. Anatomical examination of hypospadias in cattle. *J Jpn Vet Med Assoc*, 61, 931-935.
21. Kalfa N., Philibert P., Baskin LS., Sultan C., 2011. Hypospadias interactions between environment and genetics. *Mol Cell Endocrinol*, 335, 89-95.
22. Rousseaux CG., Ribble CS., 1988. Developmental anomalies in Farm Animals 2. Defining etiology. *Can Vet J*, 28, 30-40.
23. King KK., Seidel GE., Elsden RP., 1985. Bovine embryo transfer pregnancies. I. Abortion rates and characteristics of calves. *J Anim Sci*, 61, 747-757.
24. Van Soom A., Mijten P., Van Vlaenderen I., Van den Branden J., Mahmoudzadeh AR., de Kruif A., 1994. Birth of double-muscle Belgian Blue calves after transfer of in vitro produced embryos into dairy cattle. *Theriogenology*, 41, 855-867.
25. Torres AAA., Lhamas CL., Macoris DG., Vasconcelos RO., 2013. Macroscopic and microscopic findings in a set of congenital anomalies in two calves produced through in vitro production. *Braz J Vet Pathol*, 6, 65-68.
26. Dreyfuss DJ., Tulleners EP., 1989. Intestinal atresia in calves: 22 cases (1978-1988). *J Am Vet Med Assoc*, 195, 508-513.



Kaplumbağalarda Endoskopi Uygulamaları

Duygu SEZER¹, Özlem GÜZEL¹✉

1. İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, İstanbul, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
22.07.2016	18.01.2017	30.10.2017

Öz: Endoskopi birçok hastalığın tanı ve sağaltımında yararlanılan önemli bir yöntemdir. Endoskopi “iç bakı” anlamına gelir. Sürünge endoskopisi ilk kez 1983 yılında tanımlanmış ve ilk kullanımı Kuzey Amerika’da bildirilmiştir. Günümüzde özellikle cerrahi hastalıkların tanı ve sağaltımlarında, mümkün olduğunca invaziv olmayan endoskopik yöntemlerin kullanılması önem kazanmıştır. İç organlar, endoskopik görüntüleme ile net bir şekilde görülür. Laboratuvar analizleri için gerekli örnek ve biyopsiler kolaylıkla alınır. Aynı zamanda, endoskopik girişin kapatılmasında tek bir kas ve deri dikişi ya da doku yapıştırıcısı kullanılması yeterli olur. Ayrıca iyileşme süresinin kısalması da büyük bir avantaj olarak değerlendirilir. Endoskopik muayene rijit ya da fleksibl endoskoplar ile yapılır. Bu amaç ile kamera, monitör ve ışık kaynağı kullanılır. Kaplumbağalarda endoskopinin en yaygın kullanım alanlarından birisi cinsiyet tayinidir. Bunun yanı sıra, kaplumbağalarda en çok kullanılan endoskopik girişimler pulmonoskopi, özefagoskopi, gastroskopi, söloskopi ve kloakoskopidir. Bu derlemede kaplumbağalarda cerrahi hastalıkların tanı ve sağaltımlarında en yaygın kullanılan endoskopik girişimler ele alınmıştır. Böylelikle ülkemizde kaplumbağa ya da diğer egzotik hayvanlara olan ilginin artırılması, endoskopik girişimler hakkında meslektaşlarımıza bilgi sunulması ve hekimliğimiz uygulama alanına bu yöntemin yerleştirilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Endoskopi, Kaplumbağa.

Endoscopic Applications in Turtles

Abstract: Endoscopy is an important method used in the diagnosis and treatment of many diseases. It means looking inside. Reptiles endoscopy identified for the first time in 1983 and the first use is reported in North America. Nowadays, especially diagnosis and treatment of surgical disease, as much as possible using non-invasive endoscopic methods have gained importance. Internal organs are seen with endoscopic imaging clearly. Samples necessary for laboratory analysis and biopsies are taken with easily. At the same time, in the closure of endoscopic entry, the use of a single muscle and skin suture or tissue adhesive is sufficient. In addition to shortening the healing time is considered as a big advantage. Endoscopic examination is made with rigid or flexible endoscopes. For this purpose camera, monitor and light source are used. One of the most widespread use of endoscopy in turtle is sex determination. Besides, the most widely used endoscopic procedures in turtle is pulmonoscopy, esophagoscopy, gastroscopy, coelioscopy and cloacoscopy. In this review, diagnosis and treatment of surgical diseases in turtles is considered the most widely used in endoscopic procedures. Thus, in our country, increasing interest in turtles or other exotic animals, to present information to our colleagues about endoscopic procedures and veterinary medicine is intended to be placed on the application of this method.

Keywords: Endoscopy, Turtle.

GİRİŞ

Endoskopi birçok hastalığın tanı ve sağaltımında yararlanılan önemli bir yöntemdir. Günümüzde egzotik hayvanlara duyulan ilginin hızla artmış olması, veteriner hekimlerin bu alanda da yetkin olması gerçeğini ortaya çıkarmıştır. Kaplumbağaların gerek ev ortamında beslenmeleri gerekse bu hayvanların nesillerinin korunması amacıyla yapılan girişimler, onların sağlık durumları ve hastalıklarına yönelik sağaltım çalışmalarına olan ihtiyacı ortaya çıkarmıştır. Özellikle cerrahi hastalıkların tanı ve sağaltımlarında, mümkün olduğunca invaziv olmayan endoskopik yöntemlerin kullanılması önem kazanmıştır (1-3).

Endoskopi terimi, Latince endo "iç" ve skopi "bakı" kelimelerinden oluşur ve "iç bakı" anlamına gelir. İç bakı ile tanı konulması aslında yeni bir uygulama değildir. Elde edilen ilk tarihi verilere göre, Hipokrat'ın (MÖ 460-377) spekulum ile rektal muayene yaptığı anlaşılmaktadır. Profesör Harold Hopkins tarafından (1966) rod-lens teleskoplar ve fiberoptik ışık kaynaklarının üretilmesi ile daha kaliteli görüntüler elde edilmiş ve gelişim devam ederek günümüze gelinmiştir (4,5).

Sürüngen (reptil) endoskopisi ilk kez 1983 yılında tanımlanmış ve ilk kullanımı Kuzey Amerika'da bildirilmiştir (6).

Endoskopinin geleneksel cerrahi yöntemlere göre avantajlarını; iç organların net bir şekilde görülebilmesi, laboratuvar analizleri için gerekli örnek ve biyopsilerin minimal invaziv cerrahi yöntemle alınabilmesi, hastalığın tanısının kesinleştirilmesi ve daha küçük bir ensizyon ile gerekli sağaltımın yapılabilmesi oluşturur. İşlem küçük bir doku açıklığından yapılabildiğinden, hastanın iyileşme süresi de oldukça kısadır (7,8).

Kaplumbağalarda endoskopinin endikasyonlarını; plöroperitoneal boşluğun laparoskopik incelenmesi (sölaskopi), gastroskopi, kloakoskopi, üst solunum yollarının incelenmesi (pulmonoskopi), orşidektomi, böbrek muayenesi, salpingektomi, salpingotomi, vajina, kloaka ve üriner

keseden yumurtanın uzaklaştırılması ile cinsiyet tayini oluşturur (9-11).

Endoskopi sırasında ya da sonrasında, nadir olmakla birlikte, bazı komplikasyonlar gelişebilir. Sepsis, iatrojenik idrar kesesi rupturu, çok genç hayvanlarda cinsiyet ayırımının doğru yapılamaması, uygulanan tekniğin ya da ekipmanın yetersiz olması ve tecrübeye bağlı olumsuzluklarla karşılaşılabilir (12).

Endoskopik Muayene için Gerekli olan Alet ve Malzemeler

Endoskopik cerrahi uygulamalar için teleskopik lens sistemi, ksenon ışık kaynağı, vücut boşluklarına giriş ve gerekli cerrahi müdahaleleri yapabilmek için endocerrahi aletlerine ihtiyaç vardır. Endokamera ve video monitör sisteminin bulunması, daha iyi görüntü alınmasını ve kayıt yapılmasını sağlar (2,13).

Endoskopik muayene rijit ya da fleksibl endoskoplar ile yapılır. Fleksibl endoskoplar daha çok gastrointestinal sistemin muayenesi için, rijit olanlar ise sölaskopi, üst gastrointestinal kanal, kloaka, proktodeum, ürodeum, cinsiyet tayini ve idrar kesesinin görüntülenmesinde kullanılır. Endoskopi sırasında yapılacak insüflasyon, irigasyon ya da diğer endoskopik aletlerin vücut boşluklarına girişi için koruyucu kılıflar da gereklidir (4,7,14).

Sürüngenlerin endoskopik muayenesinde, vücut ağırlıkları 100 gr'ın altındaki hayvanlar için 1,9 mm x 18,5 cm teleskop sistemi (endovideo, kamera, monitör ve ksenon ışık kaynağı) ve 2.8-3.3 mm operasyon kılıfı tercih edilir. Ağırlıkları 100 gr ile 10 kg arasında olan hayvanlar için 2.7 mm x 18 cm teleskop sistemi ve 3.5-4.8 mm'lik operasyon kılıfı kullanılarak birçok endoskopik işlem gerçekleştirilir. Vücut ağırlığı 10 kg ve üzerinde olanlarda ise daha büyük teleskoplar kullanılması uygun olur (2,12).

İnsüflasyon, organ ve lens arasındaki mesafeyi sağlayıp, görüşü daha net yapabilmek için gereklidir. İnsüflasyon için söloma hava, CO₂, Laktalı Ringer Solüsyonu ya da tuzlu su verilir. Hava uygulaması gaz

embolisine yol açabilir. Bu nedenle daha çok CO₂ (3-5 mmHg) yeğlenir. Gerekli cerrahi işlemler tamamlandıktan sonra verilen CO₂ ya da tuzlu su, karın boşluğundan uzaklaştırılır. Aksi takdirde operasyon sonrası huzursuzluk, hava embolizmi ya da hastanın hareketliliğinde azalma şekillenebilir (2,13,15).

İrigasyon idrar kesesi, avidukt, kloaka ve mide gibi içi boşluklu organların endoskopik muayenesi sırasında yapılır. Bu amaçla serum fizyolojik kullanılması, mukozal ayrıntıların daha iyi görülmesini sağlar (2).

Endoskopi için kullanılacak alet ve malzemeler çok pahalı ve hassas olduğu için dezenfeksiyon, sterilizasyon ve saklanmalarının dikkatli yapılması önemlidir. Bu amaçla gaz sterilizasyon ya da soğuk sterilizasyon yöntemleri kullanılır ve aletler özel kutularında muhafaza edilirler. Bazı modern teleskoplar otoklavda steril edilebilir özellikte üretilmişlerdir (13).

Endoskopi Öncesi Hastanın Değerlendirilmesi

Endoskopi öncesi hastanın ilk değerlendirilmesi anamnez ile başlar. Barınma şartları ve beslenme şekli öğrenilir. Suda yaşayan türler için suyun tuzluluk oranı ve pH'sının uygun olup olmadığı araştırılır (16,17).

Ardından hastanın genel durumunu değerlendirmek için tam kan analizi yapılır. Kaplumbağalarda kan almak için kalp, V. jugularis, V. femoralis, V. bronşiyalis ve V. koksigealis dorsalis, plexus brahialis ile postoksipital ve subkarapasiyal sinüs uygun yerlerdir. Birçok türde en kolay V. jugular ve subkarapasiyal sinüsten kan alınabilir (1,18-20).

Kaplumbağalarda birçok faktör, kan değerlerinin değişmesine yol açar. Tür farklılığı, yaş, cinsiyet, yuvalama gibi biyolojik aktiviteler, hareketsizlik, sezon ve çevre koşulları, hemogram ve kan biyokimyasal değerlerin değişmesinde etkilidir. Hastanın kan sonuçlarının değerlendirilmesinde, bu faktörlerin dikkate alınması önemlidir (21,22).

Ağız boşluğundan ya da vücudunun herhangi bir yerinde yara varsa yaradan sürüntü alınarak, bakteriyolojik ve mikolojik kontrolleri yapılır. Dışkıda ve regurgitasyon içeriğinde parazit larva ve

yumurtaları aranır. Kandan hazırlanan sürme preparatlarda kan parazitleri olup olmadığı araştırılır. Anemi, polisitemi, inklüzyon cisimciklerinin görülmesi, lökosit sayısındaki düzensizlikler ve kan parazitlerinin saptanması halinde, genel durumun düzeltilmesinin ardından operasyon kararı verilir. Yapılan tüm bu muayeneler sonucunda kesin tanının konulmadığı durumlarda ya da tanının teyit edilmesine ihtiyaç duyulması halinde endoskopik muayeneye başvurulur (16,21,23).

Bu tür hayvanlarda bazı hastalıkların tanısında radyografik incelemelerden de yararlanır. Özellikle ürolit, bağırsak tıkanmaları, kloakada yumurta ve yabancı cisim bulunması gibi durumlarda radyolojik inceleme yararlıdır. Ancak yine de tanıyı kesinleştirmek için endoskopik muayene ile desteklenmelidir (1,4,17).

Operasyon öncesinde genel durumu iyi olmayan ve kendi kendine beslenemeyen hayvanların genel durumu desteklenmelidir. Bu amaçla hastanın elle beslenmesi gerekebilir. Ancak ağız yoluyla gıda verilmeden önce hiperürkeminin meydana gelmemesi için oral, enteral, subkutan veya intraperitoneal yolla sıvı sağaltımı uygulanarak, sıvı-elektrolit dengesi sağlanmalıdır. Kaplumbağaya verilecek sıvı miktarı, vücut ağırlığının %2-3'ünün geçmemelidir (16).

Anestezi

Kaplumbağalara anestezi uygulanmadan önce çevre ısı, doğal yaşamındaki sınırlara getirilmelidir. Çünkü enzim sistemlerinin fonksiyonları, bu ısı aralığında en iyi düzeydedir. Endoskopik muayene genel anestezi altında yapılır. Premedikasyonda atropin ve diğer mukolitik ilaçlar kullanılmaz. Preoperatif analjezi butorfanol (2 mg/kg), alfaksalon (10 mg/kg) veya meloksikam (0.2-0.4 mg/kg) gibi ilaçlarla sağlanır (17,24-26).

Anestezi propofol (3-10 mg/kg, İV) / izofloran, alfaksalon/izofloran ya da tiletamin/zolazepam ve izofloran kombinasyonlarından biri ile yapılır. Aynı zamanda, ketamin (10 mg/kg, İM, İV) / medetomidin (0.1 mg/kg, İM, İV) kombinasyonu ve lokal anestezinin (lidokain) birlikte kullanılmasıyla da sorunsuz bir anestezi elde edilebilir. İnhalasyon

anestezikleri nonbreathing sistemle verilir (24, 26-29).

Kaplumbağalarda anestezi monitörizasyonu, doppler ve kapnograf yardımıyla sağlanır. Hayvanın vücut sıcaklığının sabit tutulmasına özellikle dikkat edilir. Bunun için ısı pedleri ya da UV lambaları ile inkübatörlerden yararlanır. Postoperatif dönemde analjezinin sağlanması için damar içi non-steroid antiinflamatuvar (NSAI) ilaçların kullanılması önerilir (17,20,27).

Kaplumbağalarda Endoskopinin Kullanım Alanları

Kaplumbağalarda cerrahi hastalıkların tanı ve sağaltımlarında en çok kullanılan endoskopik girişimler aşağıda kısaca açıklanmıştır.

Pulmonoskopi

Pulmonoskopi işlemi fleksibl endoskoplar kullanılarak, akciğerlerin görüntülenmesini sağlar. Genellikle 2.7 mm, 1.9 mm ya da 1.0 mm'lik endoskoplar kullanılır. İşlem için kaplumbağa, dorsal ya da sternal pozisyonda yatırılır. Baş ve boynu gergin şekilde tutulur. Endoskop, mukozaya zarar vermeksizin, glottisin gerisine doğru yönlendirilir. Bu işlem sırasında hastaya alternatif bir hava yolu sağlanmasına gerek yoktur. Kaplumbağalarda trakeal yaklaşım, trakeanın dar olması ve kıvrımlı birincil bronşlar dolayısıyla zordur. Bu nedenle sadece büyük türlerde tercih edilir. Daha küçük kaplumbağalarda ise prefemoral boşluktan sölom içine girip, akciğerlerin kaudovertral kısmının muayene edilmesi yeğlenir (2,27).

Özefagoskopi ve Gastroskopi

Bütün kaplumbağa türlerinde özefagus ve midenin endoskopik muayenesi kolay şekilde yapılır. Ağız boşluğu, özefagus ve midenin görüntülenmesinde, rijit teleskop ve kılıflar kullanılır. İri cüsseli olanlarda, fleksibl endoskoplar gerekebilir. Kaplumbağa sternal ya da dorsal uzanımda pozisyonlandırılarak, baş ve boyun gergin hale getirilir. Aspirasyonun önlenmesi için hastanın trakeal entübasyonunun yapılması önemlidir. Hava ya da serum fizyolojik ile giriş yolu genişletilir ve mukozaya zarar vermeksizin endoskop mideye

doğru ilerletilir. İşlem sırasında bölgenin gerekli muayenesi yapılır. Bu muayenede genellikle gastrointestinal yabancı cisimler ya da mukozaya ilişkin lezyonlarla karşılaşılır (2,27,30-32).

Söloskopi

Kaplumbağalarda gerçek bir abdomen bulunmadığı için, laparoskopi yerine söloskopi terimi kullanılır. Söloskopi viseral organların muayenesi ve gerekli biyopsi materyalinin alınması için yararlanılan güvenli ve etkili bir yöntemdir (9,15,33).

Prefemoral söloskopi ile sölomik organlarının endoskopik muayenesi yapılır. Kaplumbağalarda endoskopinin klinik uygulamalarından önce, ektopik yumurtaların ve idrar kesesindeki taşların uzaklaştırılması gibi cerrahi işlemler için, geleneksel sentral plastron osteotomisi (plastrotomi) tercih edilirdi. Bu yöntem, oldukça invaziv ve uzun süreç alan bir yöntem olup, hem operasyon sonrası komplikasyon oluşma riski yüksektir hem de iyileşme süresi son derece uzundur. Oysa prefemoral yaklaşım, sentral plastron ostetomisin bahsedilen bütün bu olumsuz özelliklerini ortadan kaldıran bir yöntemdir (27,34).

Söloskopi yöntemi ile kalp, akciğerler, mide, ince bağırsaklar, kalın bağırsaklar, karaciğer, dalak, pankreas, adrenal bezler, üreme organları, böbrekler ve idrar kesesi kolay bir şekilde görülür. Bu işlem için kaplumbağa lateral pozisyonda yatırılır. Prefemoral söloskopi işlemi hem sağ hem de sol prefemoral fossa'dan yapılır. İşlem sırasında karın boşluğunun şişirilmesi için hava ya da tercihen CO₂ kullanılır. Böylelikle organlar daha net ayırt edilir. Kaplumbağaların sert kabuk yapısı nedeniyle, çok fazla kollaps gelişmeyeceğinden dolayı, kullanılan gaz miktarı daha azdır. Bölgenin aseptik olarak hazırlanmasından sonra prefemoral boşluğun merkezine 2-4 mm'lik küçük bir deri ensizyonu yapılır. Derialtı dokular diseke edilerek, bölgeye ulaşılır ve gerekli cerrahi müdahale usulüne uygun şekilde gerçekleştirilir (15,27).

Endoskopik görüntüleme veya biyopsi alımının ardından, endoskopik girişin kapatılmasında tek bir

kas ve deri dikişi ya da doku yapıştırıcısı yeterli olur (9,15,24).

Kloakoskopi

Kloakanın endoskopisi "kloakoskopi" olarak adlandırılır. Bu yöntem kloaka ve çevresinde şekillenen birçok hastalığın tanısı ve sağaltımında kullanılır. Öncelikle kloaka serum fizyolojikle yıkanarak, bölgede bulunan ürat ve feçes artıkları uzaklaştırılır. İşlem için rijit endoskop kullanılır. Kaplumbağanın büyüklüğü ya da kloaka açıklığına bağlı olmaksızın, farklı çaplardaki endoskoplar kullanılabilir. Kloakoskopi ile prodektem, ürodeum, koprodeum, distal kolon, kloaka mukozası, ürogenital papillalar, idrar kesesi, dişilerde oviduktal açıklıklar ve yumurtlayamama durumunun tanısı ve sağaltımı yapılabilir. Aynı zamanda dış bakı ile cinsiyet tayini yapılamayan bazı kaplumbağa türlerinde, cinsiyetinin belirlenmesinde ve neoplazmaların tanısında da kloakoskopiden yararlanılır. Endoskop karanial yönde kloaka içerisinde ilerletilirken, gerekli muayene ya da sağaltım uygulanır (2,3,5,7).

Sistoskopi ve Cinsiyet Tayini

İdrar kesesinin endoskopisi için endoskop, kolonun girişine ventral olan üretral açıklığa yönlendirilir. Üretral açıklık kara kaplumbağalarında horizontal, su kaplumbağalarında vertikal yerleşimlidir. Buraya Laktatlı Ringer Solüsyonun'ndan her 3-4 saniyede bir damla olacak şekilde verilerek, üretral açıklık sağlanır ve idrar kesesine giriş kolaylaştırılır. Keseye erişim sağlandıktan sonra endoskop, gonadları görene kadar dorsolateral olarak yönlendirilir (3,35). Kaplumbağalarda endoskopinin en yaygın kullanım alanlarından birisi cinsiyet tayinidir. Söloskopik cinsiyet tayini güvenli, etkili ve %100 yakın doğru sonuç verecek niteliktedir. Ancak kaplumbağaların en az 4-6 aylık olmaları ve yumurta sarısının emiliminin tamamlanmış olması önemlidir (7,12,19,29).

Postoperatif Bakım

Operasyon sonrası iştahsızlık görülmesi halinde, hastanın mide ya da özefagus tüpü yerleştirilerek, dışarıdan beslenmesi gerekir. Bu uygulama ile

Pedialyte, Emeraid II veya a/d Diet Canine/Feline verilebilir. Ayrıca destek amaçlı multivitamin (polyvisol) hastanın diyetine eklenebilir (17,20).

Operasyon sonrası en az 5 gün koruyucu antibiyotik (marbofloksasin 10 mg/kg İM) yapılır. Antibiyotığın yanı sıra, gastrointestinal sistem florasının düzenlenmesi için selüloz fermente ediciler kullanılması son derece faydalıdır (36).

SONUÇ

Endoskopi; kaplumbağaların yaşamsal faaliyetlerini olumsuz etkileyerek, ölüme kadar varan çeşitli hastalıklara neden olan yabancı cisim, foliküler staz ve yumurtlayamama gibi birçok hastalığın tanısı ve sağaltımında önemli yer tutar. Bu derleme ile ülkemizde veteriner hekimliği eğitimi ya da uygulama alanı içerisinde henüz yeteri kadar yer almayan, kaplumbağa ya da diğer egzotik hayvanların eğitim müfredatına alınması gerekliliği, endoskopik girişimler hakkında meslektaşlarımıza bilgi sunulması ve hekimliğimiz uygulama alanına bu yöntemin yerleştirilmesi amaçlanmıştır.

KAYNAKLAR

1. De la Navarre BJ., 2006. Common procedures in reptiles and amphibians. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 9, 237-367.
2. Hernandez-Divers SJ., 2006. Reptile gastrointestinal and respiratory endoscopy: The need to look inside. *Proceeding of the North American Veterinary Conference*, 20, 1631-1635.
3. Martinez-Silvestre A., Bargallo F., Grifols J., 2015. Gender identification by cloacoscopy and cystoscopy in juvenile chelonians. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 18, 527-539.
4. Chamness CJ., 1999. Equipment for the avian and exotic endoscopist. *Semin Avian Exot Pet Med*, 8, 102-106.
5. Divers SJ., 2010. Endoscopy equipment and instrumentation for use in exotic animal medicine. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 13, 171-185.
6. Wood C., Wood FE., Chrichtley KH., 1983. Laparoscopy of the green turtle, *Chelonia mydas*. *Herpetol J*, 6, 323-327.
7. Coppoolse KJ., Zwart P., 1985. Cloacoscopy in

- reptiles. *Vet Q*, 7, 243-245.
8. McCarthy TC., 2005. Veterinary endoscopy for the small animal practitioner. St. Louis (MO), 624, Elsevier.
 9. Innis CJ., Feinsod R., Hanlon J., Stahl S., Oguni J., Boone S., Schnellbacher R., Cavin J., Divers SJ., 2013. Coelioscopic orchiectomy can be effectively and safely accomplished in chelonians. *Vet Rec*, 172, 526.
 10. Mans C., Sladsky KK., 2012. Diagnosis and management of oviductal disease in three red-eared slider turtles (*Trachemys scripta elegans*). *J Small Anim Pract*, 53, 234-239.
 11. Minter LJ., Wood MW., Hill TL., Lewbart GA., 2010. Cystoscopic guided removal of ectopic eggs from the urinary bladder of the Florida cooter turtle (*Pseudemys floridana floridana*). *J Zoo Wildl Med*, 41, 503-509.
 12. Divers SJ., 2015. Endoscopic sex identification in chelonians and birds (Psittacines, Passerines and Raptors). *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 18, 541-554.
 13. Innis CJ., 2010. Endoscopy and endosurgery of the chelonian reproductive tract. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 13, 243-254.
 14. Taylor M., 1994. Endoscopic examination and biopsy techniques. In "Avian Medicine: Principles and Application", Ed., BW Ritchie, GJ Harrison, LR Harrison, 327-354, FL, Wingers Publishing, Lake Worth.
 15. Divers SJ., Stahl SJ., Camus A., 2010. Evaluation of diagnostic coelioscopy including liver and kidney biopsy in freshwater turtles (*Trachemys scripta*). *J Zoo Wildl Med*, 41, 677-687.
 16. Kurtdede A., 2001. Reptil Hastalıkları. Barışcan Ofset, Ankara.
 17. Martinez-Jimenez D., Hernandez-Divers S.J., 2007. Emergency care of reptiles. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 10, 557-585.
 18. Hernandez-Divers SM., Hernandez-Divers SJ., 2002. Angiographic, anatomic and clinical technique descriptions of a subcarapacial venipuncture site for chelonians. *J Herpetol Med Surg*, 12, 32-77.
 19. Redrobe S., MacDonald J., 1999. Sample collection and clinical pathology of reptiles. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 2, 709-730.
 20. Wappel SM., Schulte MS., 2004. Turtle care and husbandry. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 7, 447-472.
 21. Deem SL., Norton TM., Mitchell M., Segars A., Alleman AR., Cray C., Poppenga RH., Dodd M., Karesh WB., 2009. Comparison of blood values in foraging, nesting, and stranded loggerhead turtles (*Caretta caretta*) along the coast of Georgia, USA. *J Wildl Dis*, 45, 41-56.
 22. Sykes IV JM., Klaphake E., 2015. Reptile hematology. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 18, 63-82.
 23. Rostal DC., Grumbles JS., Lance VA., Spotila JR., 1994. Non-lethal sexing techniques for hatchling and immature desert tortoises (*Gopherus agassizi*). *Herpetological Monograph*, 8, 103-116.
 24. Hernandez-Divers SJ., Stahl SJ., Farrell R., 2009. An endoscopic method for identifying sex of hatchling Chinese box turtles and comparison of general versus local anesthesia for coelioscopy. *J Am Vet Med Assoc*, 234, 800-804.
 25. Jessop M., Bennett TD., 2010. Tortoises and Turtles. In "BSAVA Manual of Exotic Pets", Ed., A Meredith, C Johnson-Delaney, 249-273, BSAVA, Cheltenham.
 26. Paries S., Funcke S., Ziegler L., Lierz M., Wüst E., 2014. Endoscopic assisted orchiectomy in Herman's tortoises (*Testudo hermanni* sp.). *Tierärztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*, 42, 383-389.
 27. Divers SJ., 2010. Reptile diagnostic endoscopy and endosurgery. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 13, 217-242.
 28. MacLean RA., Harms CA., Braun-McNeill J., 2008. Propofol anesthesia in loggerhead (*Caretta caretta*) sea turtles. *J Wildl Dis*, 44, 143-150.
 29. Rakotonanahary TF., Kuchling G, Routh A., 2015. In-country anaesthesia for endoscopic sexing of the ploughshare tortoise (*Astrochelys yniphora*). *Solitaire*, 26, 11-14.
 30. Moraes-Neto M., D'Amato AF., DosSantos AS., Godfrey MH., 2003. Retrieval of and esophageal foreign body (Fish Hook) using esophagostomy in

- an olive ridley turtle, *lepidochelys olivacea*. J Herpetol Med Surg, 13, 26-28.
31. Pressler BM., Goodman RA., Harms CA., Hawkins EC., Lewbart GA., 2003. Endoscopic evaluation of the esophagus and stomach in three loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) and a Malaysian giant turtle (*Orlitia borneensis*). J Zoo Wildl Med, 34, 88-92.
 32. Mans C., 2013. Clinical Update on diagnosis and management of disorders of the digestive system of reptiles. J Exot Pet Med, 22, 141-162.
 33. Proença LM., Fowler S., Kleine S., Quandt J., Mullen CO., Divers SJ., 2014. Coelioscopic-assisted sterilization of female mojave desert tortoises (*Gopherus agassizii*). J Herpetol Med Surg, 24, 95-100.
 34. Innis CJ., Hernandez-Divers S., Martinez-Jimenez D., 2007. Coelioscopic-assisted prefemoral oophorectomy in chelonians. J Am Vet Med Assoc, 230, 1049-1052.
 35. Di Girolama N., Selleri P., 2015. Clinical Applications of Cystoscopy in Chelonians. Vet Clin North Am Exot Anim Pract, 18, 507-526.
 36. Bonner BB., 2000. Chelonian therapeutics. The Vet Clin North Am Exot Anim Pract, 3, 257-332.



Sıvı Tedavisinde Kolloidal Solüsyonların Önemi

Süleyman KOZAT¹✉

1. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Van, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
24.11.2016	17.01.2017	30.10.2017

Öz: Bu derlemede kolloidal solüsyonların sıvı tedavisindeki öneminin ortaya konulması amaçlandı. Hastalıklara bağlı olarak oluşan dehidrasyon ve/veya hipovolemik şok durumlarında hastada etkin bir sıvı tedavisi yapılmadığı takdirde oluşan şoku takiben geri dönüşümü olmayan hücre bozuklukları, organ yetmezliği ve sonunda ölüm meydana gelir. Bununla beraber pratikte yaygın olarak kullanılan %0.9 NaCl, Laktatlı Ringer gibi izotonik kristalloid solüsyonların ancak 1/4-1/5'inin dolaşımında kalması nedeniyle büyük hacimde verilmesi gerekmekte ve bunun sonucu akciğer ödemi gibi önemli komplikasyonlar gelişmektedir. Buna karşın hipovolemi ile seyreden şokların sağaltımında kullanılan kolloidal solüsyonlar, ekstrasvasküler ve intrasellüler kompartmandan intravasküler bölgeye sıvı çekerek kan volümünü kısa sürede artırır ve etkinliğini 12-24 saat sürdüğü bildirilmektedir. Kolloidal solüsyonların da relatif olarak pahalı olmasının yanı sıra koagülopati, akciğer ödemi, aşırı duyarlılık reaksiyonları ve kalsiyum konsantrasyonunda düşme gibi dezavantajları bulunmaktadır. Sonuç olarak; sıvı tedavisinde plazma hacmini artırma amacıyla uygulanacak olan kolloidal solüsyonların etkinliği kristalloid solüsyonlardan daha fazladır. Ancak kolloidal solüsyonların dezavantajlarını minimuma indirmek için sıvı tedavisinde kolloidal solüsyonların kristalloid solüsyonlarla belirli oranlarda karıştırılarak verilmesi önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kolloidal solüsyonlar, Sıvı tedavisi.

Importance of Colloidal Solutions in Fluid Treatment

Abstract: This issue was aimed to display importance of colloidal solutions for fluid treatment. Occurring dehydration or hypovolemia shock states due to diseases, which was not applied effective therapy fluid, this situation will be followed by shock, irreversible cell damage, organ failure and finally, death. However, isotonic crystalloid solutions such as 0.9% NaCl and Lactated Ringer, which are commonly used in practice, are required to be given in large volumes due to circulation of 1 / 4-1 / 5, and this leads to significant complications such as pulmonary edema. On the other hand, colloidal solutions used for the treatment of shocks with hypovolemia increase the volume of blood rapidly by pulling fluid to the intravascular region from the extravascular and intracellular compartment and its effectiveness is reported to last 12-24 hours. But colloidal solutions, which are disadvantages such as, pulmonary edema, excessive sensibility reactions decreased calcium concentrations are also excessive expensive. In conclusion, administration of colloidal solution for fluid treatment induced greater and more persistent increase in plasma volume than of those of crystalloid. However, in order to minimize the disadvantages of colloidal solutions, it is recommended that colloidal solutions be mixed with crystalloid solutions at certain ratios in fluid treatment.

Keywords: Colloidal solutions, Fluid Therapy.

GİRİŞ

Klinik uygulamalarında, sıvı tedavisinin amacı; dehidratasyon sonucu ortaya çıkan kan volümü eksikliğinin yerine konulması, esansiyel elektrolit ve besin kayıplarının karşılanması, normal hidrasyonun sürdürülmesi (1) ve mikrosirkülasyonun devamlılığının (doku perfüzyonu, dokulara oksijen taşımak) sağlanmasıdır (2). Uygun sıvı tedavisi pek çok hastalık durumunda patolojik değişimler ve sıvı dinamiklerinin anlaşılmasına ihtiyaç duyar (3,4). Etkili sıvı tedavisinde hipovolemi gelişen hastalarda oksijen salınım bozukluğunu ve yetersiz doku perfüzyonunu önlemek tedavi stratejisinin temeli olup ve eğer dehidrasyon doğrudan giderilemezse, bunu takiben gelişen şok; geri dönüşümsüz (irreversible) hücre bozuklukları, organ yetmezliği ve sonunda ölüme neden olur. İntravasküler kolloid osmotik basınç, interstisyel alan ile vasküler alan arasında sıvı hareketini sağladığı ve plazma hacmini belirlemede önemli bir belirteç olduğu belirtilmektedir (4). Kristaloit ve kolloid sıvıların pek çok volüm eksikliği durumlarında kombine kullanılabildiği ve özellikle hipotonik durumları tedavi etmek için kullanıldığı belirtilmektedir (3). Kolloidal bir solüsyon olan dekstran-70 büyük molekül ağırlığından dolayı vasküler endoteliumdan sıvının ekstravasküler alana geçişini sınırladığı ve sağladığı kolloid onkotik basınç ile albumine benzer fonksiyon yapabilmektedir (5).

Plazma hacim genişleticileri dolaşımdaki kan hacmini izotonik/izo-onkotik sıvılara göre büyük boyutta artıran hiperonkotik ve/veya hipertonic sıvılardır (6). Genellikle kolloid solüsyonlar plazma hacmini genişletmek (artırmak) için kullanılmaktadır. Kan ve derivatları (plazma) doğal; Hidroksil Etil Nişasta (HEN), jelatin ve dekstran sentetik kolloidal

maddelerdir (7,8). Kolloidal solüsyonlar uzun süre dolaşımda kalmakta, küçük miktarları yeterli etkiyi gösterdiğinden aşırı sıvı yüklemesine neden olmamaktadırlar (7,9,10). Sentetik kolloidal maddeler hipovolemi ile seyreden şokların sağaltımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tip solüsyonlar intravenöz uygulandığında kanın onkotik basıncını artarak ekstravasküler ve intrasellüler kompartmanlardan intravasküler bölüme sıvı çekmekte; plazma volümünde sağlanan artışla şok olgularında hemodinamik bozukluklar ve yetersiz doku perfüzyonu etkin bir şekilde düzeltilmektedir (7,9-11). Hipovolemik ve septik şoklu hastalarının tedavisinde kolloidal (insan serum albumin %5 veya hetanişasta %6) solüsyonların %0.9 tuz solüsyonlarına göre daha etkin olduğu belirtilmektedir (12).

Bu derlemede kolloidal solüsyonların özellikleri, bileşim, verilme miktarları, endikasyonları ve kontra endikasyonları hakkında genel bilgi verilerek ve kolloidal solüsyonların özellikleri, bileşimleri, verilme miktarları, endikasyonlar ve kontra endikasyonları hakkında genel bilgiler verilerek sıvı tedavisinde kolloidal solüsyonların avantaj ve dezavantajları ortaya konulacaktır.

VÜCUT SIVISI VE ELEKTROLİT DAĞILIMI

Vücut sıvılarının kompartmanlara göre dağılımı tablo 1'de gösterildi (1). Vücudun total sıvı miktarı; yaş, besi durumu ve cinsiyete bağlı olarak değişiklik göstermekte olup, yeni doğanlar, zayıf hayvanlar ve erkeklerde erişkin, adipose ve dişilere göre daha fazladır (7,8,13). Ayrıca, yaşa bağlı olarak vücut sıvılarının dağılımında farklılıklar bulunmaktadır (1).

Tablo 1. Vücut sıvılarının dağılımı.
Table 1. Distribution of body fluids.

Total Vücut Sıvısı Vücut Ağırlığının		
Erişkin \cong %50-60		
Yeni doğan \cong %75-80		
İntrasellüler	Ekstrasellüler	
	Ekstravasküler (interstisyel)	İntravasküler (plazma)
Vücut Ağırlığının \cong % 40 <i>İntrasellüler Sıvıdır</i>	Vücut Ağırlığının \cong % 15 <i>İntravasküler Sıvıdır</i>	Vücut Ağırlığının \cong % 5 <i>İntravasküler Sıvıdır</i>
<i>Vücut Sıvısının 2/3'sini oluşturur</i>	<i>Vücut Sıvısının 1/3'ini oluşturur</i>	

Yeni doğanlar ve genç hayvanlarda vücut sıvıları relatif olarak fazla olmasına rağmen, regülasyon mekanizmaları ve kompenzasyon yeteneğinin sınırlılığı nedeniyle bunlarda sıvı-elektrolit kayıpları hızlı gelişmekte ve kısa sürede yaşamı tehdit eder boyuta ulaşabilmektedir (7,13,14).

İshallerde sıvı-elektrolit kayıpları esas olarak ekstrasellüler kompartmandan olmakta ve bunun sonucu bu kompartmandaki sıvının volümü azalmakta, kompozisyonu değişmektedir (15-19). İntrasellüler sıvı (İSS) volümü ise, serum sodyum konsantrasyonuna bağlı olarak artış veya azalma göstermekte veya değişmemektedir (7,14,15,20,21).

Ekstrasellüler kompartmandaki sıvı volümünde azalma dehidratasyon, bu kompartman içinde intravasküler sıvı (plazma) volümündeki azalma hipovolemi olarak tanımlanmaktadır (7,13,14,18,22-24). İshale bağlı olarak ESS' da %15' lik kayıp belirgin klinik semptomların ortaya çıkmasına, % 30' luk kayıp ise ölüm şekillenmektedir (14,22-26).

İshallerde ekstrasellüler sıvının en önemli katyonu olan sodyumun kaybının su kaybından fazla olduğu ishallerde hiponatremi ve plazma osmolaritesinde azalma şekillenir (14,21). Gelişen hipotonik dehidratasyonda ESS intrasellüler kompartmana geçerek bu kompartmandaki sıvı hacmini artırır (14,15,17). Bu bağlamda ishali buzağılarda İSS' da %10'luk artışta ESS' nın %40 oranında azaldığı bildirilmektedir (17). İSS' nın aşırı artışı hücrelerin şişmesi üzerinden hücre fonksiyonlarında önemli bozukluklar ortaya yol açar ve bu durum hücrel kompenzasyon mekanizmalarının çalışmasını engeller (14).

KOLLOİDAL SOLÜSYONLAR

Kolloidal solüsyon; albumin gibi etki göstererek plazmanın korunmasını sağlayan, molekül ağırlığının yüksek olmasına bağlı olarak organizmada geç metabolize olan ve onkotik basıncı artırarak ekstrasellüler ve intrasellüler kompartmandan intravasküler bölüme sıvı çekmesiyle plazma volümünü arttırıcı etki gösteren solüsyon olarak tanımlanmaktadır (7-9,11,27). Kolloidler protein ve proteinler olmayan (sentetik) olarak iki gruptan incelenmektedir

1-Protein Kolloidler

1.1. Albumin

Albumin, doğal olarak karaciğer tarafından sentezlenen (28) plazma proteinden elde edilir (5). Safılaştırılmış bir protein fraksiyonu (globulin ile birlikte) %86 düzeyinde albumin içerir iken, insan albumin solüsyonu (HAS) %96 oranında albumin içerir (5). İzotonik (Protein %4-5) ve Konsantre (%20-25) solüsyonları mevcuttur. 100 ml HAS %25 infüzyonun intravasküler hacmi 450 ml kadar arttığı belirtilmektedir. İnsan albumin solüsyonlarının yan etkiler oldukça az olduğu ve buna bağlı anafilaktik reaksiyonların her yıl yaklaşık 1:1000 düzeyinde olduğu rapor edilmektedir (5).

1.2. Jelatinler

Jelatinler sığır kollajen hidrolisis ile üretilen polipeptidlerdir. İleri modifikasyonları jelatine bağlı urea (hemaksiel), suksinilat jelatin (jelofuzin) ve oksipolijelatinlerdir (5). Molekül ağırlığı ve etki süresi

dekstran-70'e göre kısa olan ve veteriner hekimlikte yaygın kullanımı bulunmayan bir kolloiddir (29,30). Retikuloendotelial sistem içinde proteaz katabolizması ve böbrekler tarafından hızla uzaklaştırıldıklarından jelatinlerin intravasküler yarı ömrü 1-3 saattir (5).

2. Sentetik (Non-protein) Kolloidler

2. 1. Hidroksil Etil Nişasta (HEN)

Hidroksil Etil Nişasta (HEN), amilopektinin doğal polimer bir yan dalıdır (6). Albumine benzer mekanizmayla plazma hacmini koruyucu/arttırıcı etki gösteren; ancak albumin gibi transport fonksiyonu bulunmayan bir maddedir. HEN'nin molekül ağırlığı 70.000 (düşük molekül ağırlıklı), 130.000 (orta molekül ağırlıklı) ve 450.000 (büyük molekül ağırlıklı) Dalton (Da) olarak değişen %3, 6 ve 10 solüsyonları mevcuttur. HEN'nin 1 gramının 20-30 ml su bağlama kapasitesine sahip olduğu belirtilmektedir (6,31).

Hidroksil Etil Nişasta büyük kanamalarda sonra makrofaj fonksiyonu düzeltmekte, bununla birlikte yangısal süresince kapillar sızıntıyı hafifletmektedir (6). Ayrıca bu hipertonic kolloidal solüsyonun şok olgularında kapillar perfüzyonu kolaylaştırdığı ve kapillar akımı düzenlediği belirtilmektedir (7,10).

2. 2. Dekstran

Dekstran, *Leuconostoc mesenteroides*'in sukrozu parçalamasıyla elde edilen, yüksek molekül ağırlığı olan bir glikoz polimeridir. Hayvanlarda özellikle dekstran-40 (Molekül ağırlığı: 40.000 dalton; %10'luk solüsyon) ve dekstran-70'in (Molekül ağırlığı: 70 000 dalton; %6'lık solüsyon) kullanıldığı belirtilmektedir (7,8,27,32).

Vücutta dekstran solüsyonlarının etkinliğinin öncelikle yüksek su bağlama yeteneğine dayandığı, 1 gram dekstranın 20–25 ml arasında vücut suyunu bağlayabildiği bildirilmektedir (7,11,27). Bu bağlamda 10 ml %10'luk dekstran solüsyonu infüzyonundan sonra, verilen miktara ek olarak 15 ml vücut suyu bağlanmakta ve bu yolla önemli intravasküler volüm artışı sağlanmaktadır (7). Dekstran solüsyonları bu özellikleri nedeniyle "plazma genişleticileri" olarak tanımlanmaktadır. Löwe (33), model bir hesaplamayla hematokrit (Hkt) değeri %40 olan bir hayvanda kan volümünü %10 artırmak için 32 ml/kg izotonik kristalloid solüsyon kullanılmasının gerektiğini, buna karşın aynı etkiyi 8

ml/kg dekstran solüsyonun sağladığını bildirmektedir. Bir başka çalışmada ise vücut ağırlığı 50 kg olan bir buzağıya 3 litre izotonik kristalloid solüsyon verildiğinde plazma volümünde 0.6, 0.5 litre hiperonkotik solüsyon uygulamasında ise 1.25 litre artış olacağı belirtilmektedir (7). Bu durum, izotonik kristalloid solüsyon uygulamasında verilen miktarın ancak 1/4-1/5'inin intravasküler bölümde kalması, kolloidal solüsyonun ise kanın onkotik basıncını artırarak ekstrasvasküler ve intraselüler sıvıyı intravasküler bölüme çekmesiyle açıklanmaktadır (7-11,15,33). Kozat'ın (32) ishali buzağılarda laktatlı ringer ve %6 dekstran-70+laktatlı ringer infüzyon solüsyonlarının rehidratasyon etkinliği araştırmasında %6 dekstran-70+laktatlı ringer solüsyonunun plazma volümünde uygulamanın bittiği anda %24.9, 1. saatte %19.6, 3. saatte %17.1 ve 6. saatte %12.6'lık bir artış sağlarken, laktatlı ringer'ın plazma volümündeki artışı sırasıyla; %20.3, 10.6, 6.3 ve 3.9 olarak belirlemiştir. Bu bulgular; plazma volümünde sağlanan artış ve bunun süresi açısından, %6 dekstran-70+laktatlı ringer solüsyonunun laktatlı ringer solüsyonuna üstünlüğünü belirtmektedir. Model hesaplamalar dışında klinik çalışmalar da dekstran, dekstran + kristalloid solüsyonların kristalloid solüsyonlara üstünlüğünü göstermektedir (15,20,34-37).

Dekstranın etki süresinin yarılanma süresi ile ilişkili olduğu ve sürenin dekstran-40'da yaklaşık 2.5 saat, dekstran-70'de ise 6-8 saat arasında bulunduğu belirtilmektedir (7,11,27). Molekül büyüklüğü nedeniyle dekstran-70'in uygulanan miktarının %20-30'u 24 saate kadar intravasküler bölümde kalmakta, plazma volümünde uzun süreli artış sağlamaktadır (5,7,9,10,11,27). Düşük molekülü dekstranların (<50000 D) tamamına yakını organizmayı böbrekler üzerinde terk ettiği, moleküler ağırlığı yüksek olanların ise böbrek karaciğer veya dalığın mononükleer sisteminde kısa süreli depolandığı ve buralarda endojen dekstranazla CO₂ + H₂O'ya dönüştüğü bildirilmektedir (7,8,10).

Dekstran-70 solüsyonunun 10-20 ml/kg/gün veya kan volümünün %20'sinden fazla olmayacak dozda kullanımı önerilmekte (7,9,10,27,38,39) ve bu dozda kısa süreli uygulamanın önemli bir yan etkiye yol açmadığı (15,40) bildirilmektedir. Yüksek doz veya uzun süreli dekstran-70 uygulamasında ise hipervolemi, akciğer ödemi, koagülopati, aşırı duyarlılık reaksiyonları ve plazma kalsiyum konsantrasyonunda azalma görülebilmektedir (7,8,10,15,40).

İzotonik kristalloid ve sentetik kolloidal solüsyonların plazma volümünde sağladığı artış ve etki süresi aşağıdaki gibi bildirmektedir (11):

Tablo 2. İzotonik kristalloid ve kolloidal solüsyonların plazma hacminde sağladığı artış ve etki süresi.

Table 2. Increased and effect period of plasma volume provided by isotonic crystalloid and colloidal solutions.

Solüsyon (1 L)	Plazma Volümünde Sağlanan Artış (ml)	Etki süresi (saat)
Dengeli elektrolit solüsyon	194	2
HEN (% 6)	710	12-24
Dekstran-70	800	12-24
Dekstran- 40	1000	4-6

Kristalloid ve kolloid solüsyon kullanımının avantaj ve dezavantajları tablo 3’de belirtilmektedir (7,9,10,27).

Tablo 3. Kolloid ve kristalloid solüsyonların avantaj ve dezavantajları.

Table 3. Advantages and disadvantages of colloid and crystalloid solutions.

Solüsyon	Avantajları	Dezavantajları
Kristalloid	<ul style="list-style-type: none"> • Ucuz olmaları, • İdrar oluşumunu artırmaları, • Transsellüler sıvı kazanımı, • Asit–baz dengesindeki bozuklukların düzeltilmesi. 	<ul style="list-style-type: none"> • Periferik ödem, • Akciğer ödemi • Elektrolit konsantrasyon değişiklikleri, • Asit-baz dengesindeki değişiklikler, • Kısa süreli hemodinamik etki.
Kolloid	<ul style="list-style-type: none"> • Plazma volümünde etkin ve devamlı artış, • Hemodinamiğin iyileştirilmesi, • Daha düşük intrakranial basınç artışı, • Osmotik diuresiste artış 	<ul style="list-style-type: none"> • Relatif olarak pahalı olmaları, , • Koagülopati (Dekstran), • Renal fonksiyon bozuklukları (İdrarın viskozitesinde artış), • Hipokalsemi oluşma eğilimi (Albumin sentezinin azalması), • Allerji eğiliminin artması.

Tablo 4. Kolloid solüsyonların özellikleri ve önerilen dozları (6).

Table 4. Properties and suggested doses of colloidal solutions (6).

Adı	Bileşim	Molekül Ağırlığı (kDa)	Damar içi Yarı ömrü (saat)	Hacim Etkileri (saat)	Maksimum günlük doz
Albumin % 4.5	Protein	69	>24	-	-
Hetanişasta % 6	Amilopektin türevi	450	>24	5-6	20 ml/kg (maks.1.5 Lt)
Pentanişasta % 6	Amilopektin türevi	20	10	3-4	33 ml/kg (maks.2.5 litre)
Pentanişasta % 10	Amilopektin türevi	20	10	3-4	20 ml/kg (maks.1.5 litre)
Tetanişasta-130 %6	Amilopektin türevi	130	-	2-3	50 ml/kg
Dekstran -70 % 6	Polisakkarit	70	6-8	5	1.5 g/kg
Dekstran -40 % 10	Polisakkarit	40	5	3-4	1.5 g/kg
Jelofuzin % 4	Protein	30	1-3	1-3	-
Hemaksel	Protein	35	1-3	1-3	-

SONUÇ

Dehidrasyon veya hipovolemik şok gibi durumlarda etiyotropik uygulamaların yanı sıra sıvı-elektrolit kayıplarının kısa sürede karşılanarak ve bunların sistemik etkilerinin ortadan kaldırılması gereklidir. Bu bağlamda pratikte yaygın olarak kullanılan %0.9 NaCl, Laktatlı Ringer gibi izotonik kristalloid solüsyonların ancak 1/4-1/5'inin dolaşımında kalması nedeniyle izotonik kristalloid solüsyonların büyük hacimde verilmesi gerekmekte ve bunun sonucu akciğer ödemi gibi önemli komplikasyonlar gelişmektedir. Dehidrasyon veya hipovolemik şok durumlarında Kolloidal solüsyon uygulamalarının kristalloid solüsyonlardan daha etkin belirtilmektedir (6,7,11,32). Veteriner hekimlikte dehidrasyona sahip hayvanlarda etkin bir rehidrasyon sağlamak için yeterli düzeyde sıvı uygulamasına ek olarak uygulanan sıvının plazma volümünü artırıcı özellik sağlaması da önem arz etmektedir. Sıvı sağaltımında plazma hacmini artırmada uygulanacak olan kolloidal solüsyonların kristalloid solüsyonlara göre daha etkili olduğu belirtilmektedir. Ancak kolloidal solüsyonların bazı dezavantajlarını minimuma indirmek için kolloidal solüsyonların kristalloid solüsyonlarla belirli oranlarda karıştırılarak uygulanması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Schaer M., 1989. General principles of fluid therapy in small animal medicine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 19, 203-13.
2. Yuruk K., Almac E., İnce C., 2007. Hydroxyethyl starch solution and their effect on the microcirculation and tissue oxygenation. *Transfusion Alternatives in Transfusion Med*, 9, 164-172.
3. Rudloff E., Kirby R., 1998. Fluid therapy. Crystalloids and colloids. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 28, 297-328.
4. Lüke C., Widder RA., Walter P., Brunner R., Kirchhof, B., Borberg H., 2003. The effect of membrane differential filtration on the colloid osmotic pressure in patients with age-related macular degeneration: significance to visual function? *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, 7, 263-268.
5. Concannon KT., Haskins SC., Feldman BF., 1992. Hemostatic defects associated with two infusion rates of dextran 70 in dogs. *Am J Vet Res*, 53, 1369-1375.
6. McCahon R., Hardman J., 2010. Pharmacology of plasma expanders. *Anaesthesia & Intensive Care Med*, 11, 75-77.
7. Hartmann H., 1995. Flüssigkeitstherapie bei Tieren. Gustav Fischer Verlag, Jena-Stuttgart.
8. Michell AR , Bywater RJ., Clarke KW., Hall WL., Waterman EA., 1989. *Veterinary Fluid Therapy*, Blackwell Scientific Publ, London.
9. Arnold P., Suter PF., Hagen A., 1995. Neuere Aspekte der Therapie des hypovolaemischen und septischen Schockes beim Kleintier. *Kleintierpraxis*, 40, 321-329.
10. Gammage G., 1987. Crystalloid versus colloid: Is colloid worth the cost? *International Anesthesiology Clinics*, 25, 37-60.
11. Di Bartole SP., 1992. Fluid Therapy in Small Animal Practice. W.B. Saunders Comp., Philadelphia,
12. Rackow EC., Falk JL., Fein IA., Siegel JS., Packman MI., Haupt MT., Kaufman BS., Putnam D., 1983. Fluid resuscitation in circulatory shock: a comparison of the cardiorespiratory effects of albumin, hetastarch, and saline solutions in patients with hypovolemic and septic shock. *Crit Care Med*, 11, 839-850.
13. Rossow N., 1995. Innere Krankheiten für Tierärzte. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
14. Kaske M., 1994. Pathophysiologische Aspekte der neonatalen Kälberdiarrhoe. *Tierärztl Umschau*, 49, 336-348.
15. Walker PG., Constable PD., Morin DE., Foreman JH., Drackley JK., Thurmon JC., 1998. Comparison of hypertonic saline-dextran solution and lactated Ringer's solution for resuscitating severely dehydrated calves with diarrhea. *JAVMA*, 213, 113-121.
16. Fayet JC., 1971. Plasma and faecal osmolality, water kinetics and body fluid compartments in neonatal calves with diarrhoea. *Br Vet J*, 127, 37.

17. Phillips RW., Lewis LD., 1973. Viral induced changes in intestinal transport and resultant body fluid alterations in neonatal calves. *Ann Rech Vet*, 4, 87-98.
18. Argenzio RA., 1984. Pathophysiology of neonatal diarrhea. *Agri-Practic.*, 5, 25-32.
19. Klee W., 1989. Aspekte der Behandlung neugeborener Kälber mit akutem Durchfall. *Vet*, 5, 6-17.
20. Constable PD., Gohar HM., Morin DE., Thurmon JC., 1996. Use of hypertonic saline-dextran solution to resuscitate hypovolemic calves with diarrhea. *American Journal of Veterinary Research*, 57, 97-104.
21. Kutas F., 1988. Störungen des Wasser- und Elektrolythaushaltes. In "Innere Krankheiten der Haustiere. Bd II: Funktionelle Störungen". Hrsg. Rossow, N., Horvath, Z., 478-493, G. Fischer Verlag, Jena,
22. Pospischil A., 1989. Pathologie und Pathogenese infektiöser Durchfallerkrankungen beim Kalb. *Vet*, 5, 27-32.
23. Baljer G, Wieler L., 1989. Ätiologie, Pathogenese und Immunprophylaxe der neonatalen Durchfallerkrankungen der Kälber. *Vet*, 5, 18-26.
24. Hall GA., Jones PW., Morgan JH., 1996. Calf diarrhoea. In "Bovine Medicine. Diseases and Husbandry of Cattle", Ed. Andrews, A. H., 154-180, Blackwell, Berlin.
25. Şahal M., Ünsüren H., İmren HY., 1993. Untersuchungen zur Infusionstherapie bei neugeborenen durchfaelligen Kälbern aus der Umgebung von Ankara unter spezieller Berücksichtigung einer Azidose (I. Mitteilung). *Dtsch tierärztl Wschr*, 100, 138-142.
26. Şahal M., Kurtdede A., Bökü MK., Ünsüren H., İmren HY., Özlem MB., Kalınbacak, A., 1994. Yenidoğan ishalleri buzağuların klinik bulguları ve asit-baz dengesi dikkate alınarak sodyum bikarbonat ve elektrolitik sıvılarla sağaltımı. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 41, 509-525.
27. Hapke HJ., 1983. Arzneimitteltherapie. F. Enke Verlag, Stuttgart.
28. Mazzaferro EM., Rudloff E., Kirby R., 2002. The role of albumin replacement in the critically ill veterinary patient. *J Vet Emerg Crit Care*, 12, 113-124.
29. Clark MA., 1993. Bovine coronavirus and neonatal calf diarrhoea. *Br Vet J*, 149, 51-70.
30. Göbel E., 1990. Die Kryptosporidiose des neugeborenen Kalbes: Erreger, Krankheitsgeschehen und Bekaempfung. *Prakt Tierarzt Col Vet*, 72, 14-16.
31. Finfer S., Bellomo R., Boyce N., French J., Myburgh J., Norton R., 2004. A comparison of albumin and saline for fluid resuscitation in the intensive care unit. *N Engl J Med*, 350, 2247-56.
32. Kozat S., 2000. İshalleri Buzağularda Kristalloid (Laktatli Ringer) Ve Kolloid + Kristalloid (% 6 dekstran-70+laktatlı ringer) infüzyon solüsyonlarının rehidratasyon etkinliği. Doktora Tezi, YYÜ Sağ Bil Enst, Türkiye.
33. Löwe G., 1988. Internistische Intensivmedizin. In "Innere Krankheiten der Haustiere. Bd II: Funktionelle Störungen" Hrsg. Rossow, N., Horvath, Z., 721-758, G. Fischer Verlag, Jena.
34. Hartmann H., Reder S., 1995. Einfluss von Dehydratationen auf funktionelle Parameter des Flüssigkeitshaushaltes sowie Wirksamkeit einer Rehydratation mit kristalliner oder kolloidaler Infusionslösung bei Kälbern. *Tierärztl Prax*, 23, 342-450.
35. Okrasinski EB., Krahwinkel DJ., Sanders WL., 1992. Treatment of dogs in hemorrhagic shock by intraosseous infusion of hypertonic saline and dextran. *Vet Surg*, 21, 20-24.
36. Blauhut BB., Lundsgaard -Hansen P., 1986. Albumin and the systemic circulation. *Ann Surg*, 18, 186-198.
37. Constable PD., Schmall LM., Muir WW., Hoffsis GF., Shertel, ER., 1991. Hemodynamic response of endotoxemic calves to treatment with small-volume hypertonic saline solution. *Am J Vet Res*, 52, 981-989.
38. Corke MJ., 1988. Economical preparation of fluids for intravenous use in cattle practice. *The Vet Rec*, 122, 305-307.
39. Isbister JP., Fisher, MM., 1980. Adverse effects of plasma volume expanders. *Anaesthesia and Intensive Care*, 8, 145-151.

40. Berliner AD., Lackner H., 1972. Hemorrhagic diathesis after prolonged infusion of low molecular weight dextran. Am J Med Sci, 263, 397-404.



Erzincan Tulum Peyniri

Kemal Kaan TEKİNŞEN¹, Daniş AKAR²

1. Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Konya, TÜRKİYE.
2. Halide Edip Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi, İstanbul, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
03.08.2016	07.02.2017	30.10.2017

Öz: Tulum peyniri, Trakya dışında birçok yörede kuru ve salamuralı tipte üretilen ve Türkiye'ye özgü bir peynir çeşididir. Türkiye'de beyaz peynir ve kaşar peynirinden sonra en fazla üretilen peynirdir. Tulum peyniri geleneksel olarak keçi ya da koyun derisinden yapılan tulumlarda, obruk, mağara ya da son yıllarda soğuk hava depolarında bekletilerek olgunlaştırıldıktan sonra tüketime sunulur. Erzincan tulum peyniri, Orta Anadolu ve batı da Erzincan tulum peyniri, ülkenin doğusunda ise Şavak tulum peyniri olarak bilinen kuru tipteki bir peynirdir. Halk tarafından beğenilerek tüketilen Erzincan tulum peyniri halen genellikle küçük çaplı işletmelerde hijyenik olmayan şartlarda üretilmekte ve halk sağlığı açısından potansiyel tehlike oluşturmaktadır. Standart bir üretim tekniğinin olmaması, piyasada farklı kalite ve lezzette peynirlerin olmasına sebep olmaktadır. Bu peynir çeşidine özgü duyuşsal niteliklerin bilimsel yöntemlerle incelenerek, standart üretim tekniğinin belirlenmesi; hem halk sağlığının hem de piyasa değerinin korunması için önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Erzincan tulum peyniri, Nitelik, Üretim.

Erzincan Tulum Cheese

Abstract: Tulum cheese which has also dry and brine types is produced in many regions except Thrace and it is a kind of cheese which is unique to Turkey. It is the most produced cheese in Turkey after kashar and white cheese. Tulum cheese is put on the market after it is matured traditionally in bags made of goat or sheep skin, kept in caves or cold storages in recent years. Erzincan Tulum cheese is known as Erzincan Tulum cheese in central Anatolia and in the west of Turkey, but in the east it is known as a Şavak Tulum cheese which is a dry type of cheese. Erzincan tulum cheese, which is consumed popularly by the public, it is still usually produced with unhygienic conditions in small-scale dairies and poses a potential danger for public health. The lack of a standard production technique leads to different quality and flavor of cheeses on the market. By examining the specific sensory qualities of this cheese with a scientific method, the standard production technique is determined; it is important for the protection of both public health and market value.

Keywords: Erzincan Tulum cheese, Production, Property.

GİRİŞ

Türkiye'de özellikle üretimde kullanılan sütün nevi ve uygulanan işlemlere bağlı olarak türevleriyle birlikte 130'dan fazla peynir çeşidi bulunmaktadır. Bunlar içinde en fazla üretilenler, beyaz salamura peynir, kaşar peyniri ve tulum peynirleridir (1). Tulum peynirleri, Trakya dışında ülkenin birçok yöresinde tercihen keçi veya koyun sütü karışımlarıyla üretilen farklı ambalaj materyalleri içinde (ör. deri, laklı teneke kutu, bez, plastik bidon) olgunlaştırıldıktan sonra tüketime sunulan peynirlerdir (2,3).

Ülke genelinde tulum peyniri, çoğunlukla modern teknolojiden yoksun küçük çaplı aile

işletmelerinde üretilmektedir. Üretim özellikle koyun ve keçi sütünün bol olduğu ilkbahar ve yaz aylarında mevsimlik mandıraların etkisiyle artmaktadır (4). Tulum peyniri, halkın beğeni ve talebine bağlı olarak daha fazla üretilen ve satışa sunulan yöresel peynirler içinde yer almaktadır (5,6). Ülkede 2015 yılında üretilen 665,580 ton peynirin (7) yaklaşık %10'unun tulum peynirleri olduğu (1) değerlendirildiğinde, yılda kabaca 70,000 ton tulum peynirinin üretildiği ortaya çıkmaktadır. Tulum peynirleri başlıca iki tipte yapılmaktadır (Tablo 1) (1,3,4).

Tablo 1. Tulum Peyniri Tipleri ve Başlıca Çeşitleri
Table 1. Types of Tulum Cheese and Main Varieties.

Tip	Çeşit	Üretim Yöresi
Salamura	İzmir tulum peyniri	İzmir
Kuru	Afyon tulum peyniri	Afyon
	Akçabelen (Çepni) tulum peyniri	Beyşehir
	Çimi tulum peyniri	Serik, Akseki ve Manavgat
	Divle tulum peyniri	(Üçharman) Divle
	Ereğli tulum peyniri	Ereğli
	Ermenek tulum peyniri	Ermenek
	Erzincan (Şavak) tulum peyniri	Erzincan ve Elazığ
	Giresun tulum peyniri	Giresun
	Isparta tulum peyniri	Isparta
	Karaburun lorlu tulum peyniri	Karaburun
	Karın kaymağı peyniri	Gümüşhane ve Sarıkamış
	Kayseri tulum peyniri	Kayseri
	Konya küflü peyniri	Konya
	Ordu çökelekli tulum peyniri	Ordu
	Pasinler lorlu tulum peyniri	Pasinler
Tokat tulum peyniri	Vakfikebir ve Sürmene	

Tulum peynirlerinde, üretimde kullanılan sütün nevi, üretim teknikleri, özellikle telemenin kesilmesi ve tuzlanması ile ambalajlama şekli ve olgunlaştırma şartları bakımından kısmi farklılıklar görülmektedir. Başlıca 20 kadar çeşidi bulunan ve büyük bir kısmı kuru tipte olan mahalli tulum peynirleri yaygın olarak üretildiği yöre isimleriyle anılır (3,8).

ERZİNCAN TULUM PEYNİRİ

Başlarda esas üretimi gerçekleştiren ve Tunceli'de yerleşim gösteren Şavak aşiretin ismiyle anılan bu peynir, günümüzde ticaretinin Erzincan'da ön plana çıkması nedeniyle ülke genelinde Erzincan tulum peyniri olarak tanınmaktadır. Bu peynir yöresel

olarak genellikle Tunceli, Erzincan, Bingöl, Elazığ'daki zengin bitki çeşitliliğine sahip yüksek rakımlı yaylalarda Mayıs-Eylül ayları arasında bölge halkı tarafından yapılmaktadır. Erzincan tulum peynirinin üretiminde genellikle Akkaraman koyunlarının sütü tercih edilmekte ise de Morkaraman koyunlarının sütü de yaygın şekilde kullanılmaktadır (9-11).

Erzincan İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü (9), Erzincan'da tulum peynirinin yıllık üretim miktarının yaklaşık 4-5 bin ton civarında olduğunu, ticari hacim anlamında ise yaklaşık 90-100 milyon lira ekonomiye katkı sağladığını bildirmektedir.

ERZİNCAN TULUM PEYNİRİNİN ÜRETİM TEKNİĞİ

Geleneksel Üretim

Geleneksel üretimde çoğunlukla koyun sütü tercih edilmekte ise de koyun sütüne inek ve keçi sütü ilave edilerek de üretim yapılabilmektedir (12-15). Sağım sonrası süt 2-3 kez süzülmekte, çiğ olarak 28-32°C sıcaklıklarda mayalanmaktadır. Mayalamada genellikle ticari peynir mayaları kullanılmaktadır. Pıhtılaşma süresi maya aktivitesine ve miktarına bağlı olarak 1-4 saat arasında değişmekle birlikte en uygun sürenin 36°C'de 45 dakika olduğu bildirilmektedir (16).

Pıhtılaşmayı takiben, pıhtı gelişi güzel parçalanmakta, bazen pıhtıya 15-20 dakika yaklaşık 45°C'de ısıtma işlemi uygulanmaktadır. Takiben pıhtı elyaf çuvallara doldurularak 14-16 saat süreyle kendi halinde peynir suyunun uzaklaşması amacıyla serin bir ortamda bekletilmektedir. Son zamanlarda genellikle 2-2,5 saat gibi bir süreyle baskılama işlemi yapılarak, peynir altı suyunun daha kısa sürede uzaklaşması sağlanmakta, sonrasında ise elde edilen teleme, elle veya sopalarla iyice parçalanmaktadır. Bazı yörelerde teleme, suyunun iyice uzaklaşması için tekrar torbalara konmakta, 1-3 gün süreyle baskıda bekletilmektedir. Son aşamada teleme iyice parçalanarak % 2-5 oranında kuru tuzlama işlemine tabi tutulmaktadır. Bu süreçte bazı işletmelerde telemeye yoğurt eklenmekte, 2-3 saatte bir karıştırılmak suretiyle 18-24 saatlik ön olgunlaştırma işlemi uygulanmaktadır (10,17,18).

Bazı işletmelerde, peynir altı suyunun tam olarak süzülebilmesi için, kısmen süzölmüş olan pıhtı,

bez torbalara doldurulmakta, 3-4 sıra üst üste konarak istifleme ağırlığıyla ve periyodik olarak yerlerinin değiştirilmesi suretiyle 10-15 gün baskı altında bekletilmektedir. Baskı uygulanmadan yapılan yavaş süzölme işleminin peynir altı suyuyla beraber yağ kaybını azalttığı bildirilmektedir.

Daha sonra keçi derisinden hazırlanmış tulumlara hava kalmayacak şekilde sıkıca doldurma işlemi gerçekleştirilmektedir. Son yıllarda plastik bidonlar kolay elde edilmesi, ucuz ve dayanıklı olması nedeniyle bu amaçla kullanılmaktadır (17,19,20). Doldurma işlemi gerçekleştirilen plastik bidon ve/veya tulumlar alt kısımlarının birkaç yerinden delinmek suretiyle, sıcaklığı 3-6°C ve nisbi nemi %70-85 olan depolarda veya doğal mağaralarda 90-120 gün olgunlaştırma işlemine tabi tutulmaktadır (18). Randımanın karışık yağlı sütten yapılanlarda ortalama % 12 civarında olduğu bildirilmektedir (1).

Ticari Üretim

Son yıllarda Erzincan tulum peynirine artan talebin karşılanabilmesi amacıyla daha kolay olan ve az işçilik gerektiren bir üretim şeklide uygulanmaktadır. Ticari üretim tekniği olarak gerçekleştirilen bu yöntemde, üreticiler tarafından genellikle kelle peynir olarak da bilinen teleme kullanılmaktadır. Birçok üretici tarafından tercih edilen bu yöntemle 100 kg kelle peynirden 60 kg peynirin elde edilebildiği belirtilmektedir. Geleneksel üretim tekniğindeki bazı işlemler temel alınarak gerçekleştirilen ticari üretim tekniğinin aşamaları, Şirin Tulum Peynirleri San. Tic. Ltd. Şti. (Teşekkür) ile karşılıklı görüşmelerde elde edilen bilgiler ışığında, Tablo 2'de gösterilmektedir.

Tablo 2. Erzincan Tulum Peynirinin Ticari Üretim Tekniği.

Table 2. Commercial Production Technique of Erzincan Tulum Cheese.

Telemenin parçalanması ve tuzlanması
Telemenin baskılanması
Telemenin kalıplanması
Telemenin olgunlaştırılması
Paketleme ve satış

Telemenin Parçalanması ve Tuzlanması:

Teknelerde yağlı kelle peynirler nohuttan daha küçük parçalara ayrılır ve tadına bakılmak suretiyle %3-5 oranında kuru tuzlama işlemine tabi tutulur (Şekil 1).



Şekil 1. Telemenin Parçalanması ve Tuzlanması.
Figure 1. Cutting and Salting of the Curd.

Telemenin Baskılanması: Tuzlama işlemi gerçekleştirilen teleme bez çuvallara 40-50 kg miktarlarda sıkıca doldurulur. Takiben 5-6 torbanın istiflenmesi ve periyodik olarak yerlerinin değiştirilmesi suretiyle 3-5°C'de 10-15 gün süreyle baskılama işlemi gerçekleştirilir (Şekil 2).



Şekil 2. Telemenin Baskılanması.
Figure 2. Pressing of the Curd.

Telemenin Kalıplanması: Teleme yüksek devirli bir parçalama makinesiyle nohuttan daha küçük parçalara ayrılır (Şekil 3) ve 1, 2, 5, 10 ve 20 kilogramlık plastik bidonlara hava boşluğu kalmayacak şekilde dolun işlemi gerçekleştirilir (Şekil 4). Dolun işlemi deri tulumlara, makineyle uygun olmadığından, tahta sopalarla gerçekleştirilir. Tulumlar dikilmek suretiyle kapatılır.



Şekil 3. Baskılanmış Telemenin Makinede Parçalanması.
Figure 3. Cutting of Pressed Curd in the Machine.



Şekil 4. Plastik Bidonlara Doldurma
Figure 4. Filling of the Plastic Drums.

Telemenin Olgunlaştırılması: Dolun işlemi sonrası 3-4°C'deki soğuk hava depolarında 90 gün süreyle olgunlaştırma işlemi gerçekleştirilir (Şekil 5-6).



Şekil 5. Plastik Bidonlarda Olgunlaştırma.
Figure 5. Maturation in the Plastic Drums.



Şekil 6. Tulumlarda Olgunlaştırma.
Figure 6. Maturation in the Skin Bags.

Paketleme ve Satış: Peynirler olgunlaştırıldığı ambalaj materyalleri içinde satışa sunulabildiği gibi, tulum veya bidonlardan çıkartılıp farklı şekil ve miktarlarda, vakum paketleme yapılmak suretiyle de satışa sevk edilebilmektedir (Şekil 7).



Şekil 7. Vakum Paketleme.
Figure 7. Vacuum Packaging.

ERZİNCAN TULUM PEYNİRİNİN NİTELİKLERİ

Duyusal Nitelikler

Genellikle subjektif olarak belirlenen peynirin lezzet ve aroması, son yıllarda geliştirilen bir kısım analiz yöntemleri yardımıyla, özellikle bazı volatil bileşiklerin belirlenmesi suretiyle, tespit edilebilmektedir. Nitekim Hayaloglu ve ark. (20) çığ koyun sütünden yaptıkları 90 gün olgunlaştırılmış tulum peynirlerinde katı faz ekstraksiyon metoduyla çok sayıda farklı uçucu bileşikleri tespit ettiklerini, ana unsurların aroma üzerinde etkili olan kısa zincirli yağ asitleri, 2-bütanon, diasetil ve primer alkoller olduğunu bildirmişlerdir. Peynirler rutubet miktarları dikkate alındığında tekstürel bakımdan çok sert, sert, yarı sert ve yumuşak olarak dört tipte değerlendirilirler (1). Tulum peynirleri tekstürel bakımdan sert (%20-42 rutubet) veya yarı sert (%43-55 rutubet) (1) (Tablo 3) niteliğe sahiptirler.

Erzincan tulum peyniri; beyazdan krema kadar değişen renklere, kuru madde oranı fazla, kendine has tereyağı aroması hissedilen ancak belirgin ekşimsi tatta olan, kolayca dağılmayan, gözeneksiz ve pürüzsüz yapıya sahip bir peynir çeşididir. Diğer taraftan üretiminde çoğunlukla standart bir işleme tekniğinin uygulanmaması neticesinde piyasada farklı lezzet ve kalitede peynirlere rastlanılabilmektedir (10).

Kimyasal Nitelikler

Erzincan tulum peyniri, üretiminde tam yağlı koyun sütü veya karışımının tercih edilmesi ile uygulanan işlemler neticesinde, kuru maddede yağ miktarı bakımından tam yağlı veya yarım yağlı (sırasıyla kuru maddede ≥ 45 , $\geq 25 - < 45$ yağ içeren) peynirler sınıflarında (21) yer almaktadır. Üretim tekniğine bağlı olarak, kaba kimyasal bileşiminde ortalama %43 kuru madde, %28.5 yağ ve %3.8 tuz bulunmaktadır (Tablo 3). Erzincan tulum peynirinin kaba kimyasal bileşimini belirlemek amacıyla yapılan bazı araştırmaların sonuçları Tablo 3'de gösterilmektedir.

Tablo 3. Erzincan Tulum Peynirinin Yüzde Kimyasal Bileşimi ile Asidite ve pH Değerleri.
Table 3. Chemical Composition (%) and Acidity and pH Values of Erzincan Tulum Cheese.

Rutubet	Yağ	Protein	Tuz	Kül	Asidite*	pH	Kaynak
46.79	28.20	18.51	3.44	-	1.83	-	(10)
37.29	34.96	21.54	4.66	5.50	1.66	-	(22)
44.50	25.73	24.56	3.26	-	1.82	-	(23)
42.81	-	-	-	-	1.41	5.30	(24)
42.07	24.49	-	3.38	4.47	1.39	-	(25)
46.29	27.76	16.91	3.44	5.22	1.61	-	(26)
39.17	30.03	24.63	4.30	5.82	1.88	-	(27)**

* : laktik asit cinsinden, **: Geleneksel yöntemle yapılan ortalama

Türk Gıda Kodeksi Peynir Tebliği'nde (21) tulum peyniri, ham maddenin peynir mayası kullanılarak pıhtılaştırılması ile elde edilen telemin fermentasyonunu takiben ufalanıp tuzlanması, daha sonra gıdaya temasa uygun bir ambalaj malzemesine veya deri tulumlara sıkıca basılarak üretilen ve olgunlaştırıldıktan sonra piyasaya arz edilen çeşidine özgü karakteristik özellikler gösteren peynir olarak tanımlanmakta, üretiminde kullanılan deri tulumların koyun, keçi ve buzağıdan elde edilebileceği, deri tulumların her türlü zoonoz enfeksiyondan arı, peynire ağır metal ve yabancı madde bulaşması yapmayacak şekilde temiz ve kuru olması gerektiği belirtilmektedir. İlgili tebliğde peynirlerin kuru madde de yağ miktarı yönünden dört sınıfta (Tam yağlı, Yarım yağlı, Az yağlı, Yağsız) değerlendirildiği, tam yağlı olanların 100 gram kuru maddede ≥ 45 gram, yarım yağlıların $\geq 25 - < 45$, az yağlıların $\geq 10 - < 25$ süt yağı içermesi gerektiği, diğer taraftan 10 gramdan az süt yağı içerenlerin yağsız tulum peyniri olarak satılabileceği öngörülmektedir. Ayrıca rutubet miktarının tam yağlı tulum peynirlerinde en çok %45, yarım yağlı, az yağlı, yağsız tulum peynirlerinde ise en çok %50 olabileceği ve kuru maddede en çok %5 oranında mutfak tuzu içerebileceği bildirilmektedir. Tablo 3'deki verilerden Erzincan tulum peynirinin kimyasal bileşiminin oldukça geniş sınırlar içinde değiştiği, standart bir üretim ve ürün bileşiminden söz etmenin oldukça zor olduğu anlaşılmaktadır.

Mikrobiyolojik Nitelikler

Peynirde genel ve laktik asit mikroorganizma sayılarının bilinmesinin pek az önemi vardır; çünkü peynirde mevcut mikroorganizmaların sayıları ve tipleri, başlıca pH değeri, rutubet miktarı ve olgunluk

derecesine göre farklılık göstermektedir. Bu nedenle de peynirin mikrobiyolojik kontrolünde, kesin sayısal standartların uygulanmasından kaçınılmaktadır. Peynirin mikrobiyolojik muayenesi daha çok halk sağlığı için tehlikeli ve üründe bozukluklara neden olan mikroorganizmaların (örn., koagülaz-pozitif *Staphylococcus*, koliform bakterisi, maya ve küf mikroorganizmaları) sayısını saptamak için yapılmaktadır. Yumuşak ve taze peynirler, sert ve yarı sert olanların aksine, su aktivitesi ve pH değerlerinden dolayı soğukta muhafaza edilmedikleri sürece kısa sürede bozulmaktadır. Birçok peynir tipinin, özellikle çiğ süttten yapılanların *Salmonella enteritidis* vakalarına neden olduğu belirtilmektedir. *Salmonella*'ların peynirde düşük pH'da zamanla öldükleri ancak, önemli sayıda *Salmonella*'nın peynirde iki aydan fazla canlılıklarını da muhafaza ettiği gözlemlenmiştir (1).

Kurt ve ark. (10) Erzurum ve Erzincan il merkezleri ve çevre mandıralardan aldıkları Erzincan tulum peyniri örneklerini mikrobiyolojik özellikler açısından inceleyerek, peynirin üretim ve pazarlama sırasında yüksek düzeyde mikrobiyel kontaminasyona maruz kaldığını belirlemişlerdir. Nitekim araştırmacılar maya küf sayısını ortalama 1.87×10^6 adet/g, koliform grubu bakteri sayısını ise ortalama 3.25×10^6 adet/g olarak bildirmişlerdir.

Çakır (28), yaptığı araştırmada tüketime sunulan Erzincan tulum peyniri örneklerinde *E. coli* O157:H7 ve koagülaz pozitif *S. aureus* tespit edilmemesine rağmen diğer mikrobiyolojik nitelikler bakımından Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'nde belirtilen kriterlere uygun olmadığını tespit etmiştir.

Şengül ve ark. (29) yaptıkları araştırmada olgunlaşma süresince koliform bakteri sayısının

azaldığını ve çiğ süttten yapılan tulum peyniri örneklerinin olgunlaşmanın 90. günde Türk Standartları normlarına uyum sağladığını belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar pastörize süttten ürettikleri ve farklı ambalaj materyallerinde olgunlaştırdıkları tulum peynirlerinde *S. aureus*'un tespit edilemediğini, bu durum üzerinde, pastörizasyon işlemi ile olgunlaşma sürecinin etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Azak (30), yaptığı çalışmada 100 adet Erzincan tulum peyniri örneğinin %3'ünde *Listeria monocytogenes*' in izole ve identifiye edildiğini dolayısıyla bölgede etkenle bulaşık tulum peyniri tüketiminin, halk sağlığı açısından risk oluşturabileceğini bildirmiştir. Nitekim Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'ne göre 25 gram peynir örneğinde *Listeria monocytogenes* bulunmaması gerektiği (31) bildirilmektedir. Ayrıca çalışmada tulum peynirinin çiğ süttten yapılması nedeniyle, peynir yapılacak süttün sağlıklı işletmelerden alınmasının yanı sıra, üretim ve saklama işlemleri sırasında hijyenik tedbirlerin azami şekilde uygulanmasının önemi belirtilmiştir.

Yıldırım (32), yaptığı çalışmada geleneksel Şavak tulum peynirinin olgunlaştırılması esnasında aside adapte ve adapte edilmemiş *Salmonella*'ların olgunlaştırmanın 0., 15., 30. günlerinde sayıları arasında önemli bir farkın olmadığını diğer taraftan 45. günde aside adapte edilmemiş *Salmonella* grubundaki patojen seviyesinin tespit edilebilir seviyenin altında olduğunu, aside adapte edilmiş patojen sayısında ise artış görüldüğünü belirtmiştir. Diğer taraftan 60. günde bu artışın ortadan kalkarak tespit edilebilir seviyenin altında kaldığı vurgulanmıştır.

SONUÇ

Araştırmalar tüketime sunulan Erzincan tulum peynirlerinin kimyasal bileşimin oldukça geniş sınırlar içinde değiştiğini, mikrobiyolojik nitelikleri bakımından ise çok iyi kalitede olmadığını göstermektedir. Kendine has duyuşsal özellikleri nedeniyle ülke genelinde sevilerek tüketilen Erzincan tulum peynirinin üretim tekniği ve kalitesinin geliştirilerek yasal standartlarda yer alması piyasa

değerinin korunması yanı sıra dış ülkelerde de tanınmasını ve tüketilmesini sağlayarak ülke ekonomisine katkı sağlayabilecektir.

TEŞEKKÜR

Bu makalenin hazırlanması sırasında karşılıklı görüşmelerde verdiği bilgilerden dolayı Sayın Adnan Şirin'e (Şirin Tulum Peynirleri San. Tic. Ltd. Şti./Erzincan) teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Tekinşen OC., Tekinşen KK., 2005. Süt ve Süt Ürünleri: Temel Bilgiler, Teknoloji, Kalite Kontrolü. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya.
2. Keleş A., Atasever M., 1996. Divle tulum peynirinin kimyasal, mikrobiyolojik ve duyuşsal kalite nitelikleri. Süt Teknolojisi, 1, 47-53.
3. Ünsal A., 1997. Süt Uyuyunca–Türkiye Peynirleri. I. Baskı, Yapı Kredi Kültür Sanat Yayıncılık Ticaret ve Sanayi Anonim Şirketi, İstanbul.
4. Kılıç S., Gönç S., Uysal H., Karagözlü C., 1998. Geleneksel yöntemle ve kültür kullanılarak yapılan İzmir tulum peynirinin olgunlaşma süresince meydana gelen değişikliklerin kıyaslanması. Geleneksel Süt Ürünleri. Milli Produktivite Merkezi Yayın No: 621, 43-64, Mert Matbaası, Ankara.
5. Dağdemir V., 2000. Erzincan ilinde tulum peynirinin imalat maliyeti ve pazarlama marjının belirlenmesi üzerine bir araştırma. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 24, 57-61.
6. Devlet Planlama Teşkilatı., 2001. Gıda Sanayii Özel İhtisas Komisyonu Raporu: Süt ve Mamulleri Sanayii Alt Komisyonu Raporu. 8. Beş Yıllık Kalkınma Raporu. Yayın No: 2696, Ö.İ.K, 644. Devlet Planlama Teşkilatı, Ankara.
7. Asüd., 2016., Türkiye'de Süt ve Süt Ürünleri Üretimi 2015: Asuder Verileri. Ambalajlı Süt ve Süt Ürünleri Sanayicileri Derneği, Ankara.
8. Tekinşen KK., Uçar G., 2007. Konya yöresinde üretilen mahalli tulum peynirleri. Akademik Gıda, 5, 33-37.
9. Erzincan İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü., 2016. Tulum Peynirinin Geleceği Tartışıldı. Haber 153. Erzincan.

10. Kurt A., Çağlar A., Akyüz N., Çakmakçı S., 1991. Erzincan (Şavak) tulum peynirinin kimyasal özellikleri. *Gıda*, 16, 295-302.
11. Yıldırım F., 2010. Şavak Topluluğunun Yaşam Tarzı ve Erzincan Tulum Peynirinin Yapılışı. 26.02.2010 Röportaj. Sekakan Wordpress.
12. Güler Z., Uraz T., 2004. The quality and chemical properties of market Tulum cheese. *International Journal of Food Properties*, 9, 551-557.
13. Öner Z., Şimşek B., Sağdıç O., 2003. Determination of some properties of Turkish Tulum Cheese. *Milchwissenschaft*, 58, 152-154.
14. Şengül M., Çakmakçı S., 1996. Çiğ ve pastörize inek sütünden yapılan ve farklı ambalaj materyallerinde olgunlaştırılan tulum peynirlerinde bazı kalite kriterleri. *Süt Teknolojisi Dergisi*, 1, 13-21.
15. Yılmaz G., Ayar A., Akın N., 2005. The Effect of microbial lipase on the lipolysis during ripening of Tulum cheese. *Journal of Food Engineering*, 69, 269-274.
16. Karabrahimoğlu Y., Üçüncü M., 1988. Erzincan Tulum Peynirinin işlem ve ürün parametrelerinin belirlenmesi. *Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi*, Seri B 6, 79-97.
17. Güven M., 1993. İnek, Koyun ve Keçi Sütlerinden Üretilen ve Farklı Materyallerde Olgunlaştırılan Tulum Peynirlerinin Özellikleri Üzerine Karşılaştırılmalı Bir Araştırma. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
18. Koca N., 1996. Çeşitli Starter Kültür Kombinasyonlarının İzmir Teneke Tulum Peynirlerinin Nitelikleri Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
19. Öksüztepe G., Patır B., Çalıcıoğlu M., 2005. Identification and distribution of lactic acid bacteria during the ripening of Şavak Tulum cheese. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29, 873-879.
20. Hayaloglu AA., Cakmakci S., Brechany EY., Deegan KC., McSweeney PL., 2007. Microbiology, biochemistry, and volatile composition of Tulum cheese ripened in goat's skin or plastic bags. *Journal of Dairy Science*, 90, 1102-1121.
21. Türk Gıda Kodeksi., 2015. Peynir Tebliği. Tebliğ No. 2015/6. Resmi Gazete Tarih 08.02.2015, Sayı: 29261. Başbakanlık Basımevi, Ankara.
22. Akyüz N., 1981. Erzincan (Şavak) tulum peynirinin yapılışı ve bileşimi. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 12, 85-112.
23. Arıcı M., Şimşek O., 1991. Kültür kullanımının tulum peynirinin duyuşsal, fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerine etkisi. *Gıda*, 16, 53-62.
24. Bostan K., Uğur M., 1992. Tulum peynirlerinde starter kültür kullanımı üzerine bir araştırma. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17, 97-110.
25. Bostan K., Uğur M., Aksu H., 1992. Deri ve plastik bidonlar içinde satışı sunulan tulum peynirlerinin duyuşsal, fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri. *Pendik Hayv Hast Merk Araşt Enst Derg*, 23, 75-83.
26. Diğrak M., Yılmaz Ö., Özçelik S., 1994. Elazığ kapalı çarşısında satışı sunulan Erzincan tulum (Şavak) peynirlerinin mikrobiyolojik ve bazı fiziksel-kimyasal özellikleri. *Gıda*, 19, 381-387.
27. Ceylan ZG., Çağlar A., Çakmakçı S., 2007. Some physicochemical, microbiological, and sensory properties of Tulum cheese produced from ewe's milk via a modified method. *International Journal of Dairy Technology*, 60, 191-197.
28. Çakır O., 2011. Erzincan Tulum Peynirinin Bazı Fiziksel, Kimyasal ve Mikrobiyolojik Özelliklerinin Tespiti ile Bu Örneklerde Koagülaz (+) *S. aureus* ve *E. Coli* O157: H7'nin aranması. Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
29. Sengül M., Türkoğlu H., Çakmakçı S., Çon A., 2001. Effects of casing materials and ripening period on some microbiological properties of tulum cheese. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4, 854-857.
30. Azak MG., 2011. Erzincan İli Tulum Peynirlerinde *Listeria* spp. İzolasyonu ve İdentifikasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
31. Türk Gıda Kodeksi., 2001. Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği. Tebliğ No. 2001/19. Resmi Gazete Tarih

02.09.2001, Sayı: 24511. Başbakanlık Basımevi,
Ankara.

32. Yıldırım H., 2014. Geleneksel Şavak Tulum Peynirin Olgunlaştırılması Esnasında Aside Adapte ve Adapte Edilmemiş Salmonella'ların Yaşamının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Tunceli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tunceli.

YAZARLARA BİLGİ

1. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nin hakemli bilimsel yayın organı olup, Nisan, Ekim ve Aralık aylarında olmak üzere yılda 3 kez yayımlanır. Derginin kısaltılmış ismi "Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg." dir.

2. Bu dergide, Türkçe veya İngilizce dillerinden birinde hazırlanmış ve daha önce başka bir dergide yayınlanmamış veya başka bir dergiye eşzamanlı olarak sunulmamış Temel Veteriner Bilimleri (Anatomi, Biyokimya, Fizyoloji, Histoloji, Mesleki Etik ve Deontoloji), Klinik Öncesi Veteriner Bilimleri (Farmakoloji ve Toksikoloji, Mikrobiyoloji, Parazitoloji, Patoloji, Viroloji), Klinik Veteriner Bilimleri (İç Hastalıkları, Cerrahi, Doğum ve Jinekoloji, Dölerme ve Suni Tohumlama), Zootekni ve Hayvan Besleme Bilimleri (Biyostatistik, Genetik, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları, Hayvancılık İşletme Ekonomisi, Zootekni), Hayvansal Orjinli Gıda Hijyeni ve Teknolojisi, Egzotik Hayvanlar Bilimi ve Laboratuvar Hayvanları Bilimi alanlarında hazırlanmış orijinal araştırma makalesi, olgu sunumu ve davetli veya editörün onayı alınmış derlemeler yayımlanır.

3. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi'ne yayımlanması amacıyla gönderilen makale ile ilgili olarak; yazarlar gerekli olan etik kurulu onayı aldıkları kurum ve onay numarasını makalenin Materyal ve Metot kısmına yazmalıdırlar. Yayın kurulu eğer isterse etik kurul onay belgesini isteyebilir.

4. Yazarlar, başka kaynaklardan alınan ve kullanılan materyal ile ilgili telif hakkı şartlarına uymak ve telif hakkının dergiye devrini ifade eden sözleşmeyi imzalamakla yükümlüdürler. Dergide yer alan yazılardan doğacak her türlü sorumluluk yazar(lar)ına aittir.

5. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nca belirtilen "İhbarı Mecburi Hastalıklar" ile ilgili makalelerin değerlendirmeye alınabilmesi için T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'ndan alınmış izin yazısının Dergi Editörlüğüne sunulması zorunludur.

6. Makaleler değerlendirme için en az iki hakeme gönderilir. Makalenin yayına kabulü, hakemlerin ve dergi editörlüğünün kararına bağlıdır.

7. Sorumlu yazar Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisine yayımlanmak üzere göndereceği makale ile birlikte "**Makale Kontrol Formu**"nu da göndermek zorundadır.

8. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi Editörlüğüne ulaşan makale ve makale kontrol formu, dergi editörlüğünce ön değerlendirmeye tabi tutulur. Editörlük, ön değerlendirme sonucuna göre makaleyi reddetme veya hakem değerlendirmesine tabi tutmadan önce düzeltme isteme hakkına sahiptir.

MAKALENİN HAZIRLANMASI

1. Makaleler, A4 dosya kâğıdına (tek yüz), çift satır aralıklı olarak, kenarlarından 3 cm boşluk bırakarak yazılmalı, şekil, tablolar ve kaynaklarda dahil olmak üzere sayfa sayısı orijinal

bilimsel araştırmalarda ve derlemelerde 16, olgu sunumu gibi kısa bilimsel çalışmalarda ise 5 sayfayı geçmemelidir.

2. Makale, Microsoft Word 6.0 veya daha st versiyonda, Calibri karakterinde ve 12 punto ile hazırlanmalıdır.

3. Makaleye satır numaraları (makalenin 2. sayfasından başlamak üzere sürekli olacak şekilde) ve sayfa numaraları (sayfa altında ve ortalı) eklenmelidir.

4. Makale ile ilgili açıklayıcı bilgiler (tez, proje, vb.) makale başlığının sonuna st simge olarak * işareti konulup makale başlığı altında italik yazıyla açıklanmalıdır.

5. Araştırmaya konu olan maddelerin ve ürünlerin ticari adları kullanılmamalıdır.

Orijinal Bilimsel Araştırma Makaleleri İçin:

Birinci Sayfa: makalenin birinci sayfası başlık, yazar isimleri ve adresleri, yazarların e-posta adresleri, sorumlu yazar iletişim bilgileri ve eğer varsa makale ile ilgili açıklayıcı bilgidir oluşmalıdır.

Başlık: Türkçe ve İngilizce başlıklar sadece ilk harfleri büyük olacak şekilde yazılmalıdır. Makalenin dili Türkçe ise önce Türkçe sonra İngilizce başlık, makalenin dili İngilizce ise önce İngilizce sonra Türkçe başlık yazılmalıdır.

Yazar İsimleri ve Adresleri: Yazar(lar)'ın adı ve soyadının (akademik nvansız) sadece baş harfleri büyük ve başlığın altına ortalı gelecek şekilde yazılmalıdır. Sorumlu yazar (*) ile işaretlenmeli, yazarların isminin sağ st köşesine sayı eklenmeli ve bu sayılar adresler bölümünde kullanılmalıdır. Yazarların adresinde; bağlı olduğu kurum, birim, şehir ve ülke belirtilmelidir.

Yazarların e-posta Adresleri: makalede ismi bulunan tüm yazarların ismi ve e-posta adresleri yazılmalıdır.

Sorumlu Yazar İletişim Bilgileri: Makalenin sorumlu yazarına ait isim-soyisim, e-posta, adres, telefon, GSM ve fax numaralarını içeren bilgiler yazılmalıdır.

Makale ile İlgili Açıklayıcı Bilgi: Eğer varsa makale ile ilgili açıklayıcı bilgiler (tez, proje vb.) birinci sayfanın sonunda italik yazıyla açıklanmalıdır.

İkinci Sayfa: Makalenin ikinci sayfası Türkçe zet ve anahtar kelimeler ile İngilizce zet ve anahtar kelimeleri içermelidir. Makale yazım dili Türkçe ise öncelikli olarak Türkçe zet ve anahtar kelimeler; eğer makale yazım dili İngilizce ise öncelikli olarak İngilizce zet ve anahtar kelimeler sunulmalıdır.

zet: Kısaca amaç, materyal, metot, bulgular ve sonuçları içermelidir. Özetlerde kullanılacak kelime sayısı 170-200 kelime arasında olmalıdır ve tek satır aralıklarla yazılmalıdır.

Anahtar kelimeler: Anahtar kelimeler “Türkiye Bilimleri Terimleri” nden seçilmelidir (<http://www.bilimterimleri.com/tr-index.html>). En fazla 5 adet olmalıdır. Türkçe anahtar kelimeler Türkçe’ye göre, İngilizce anahtar kelimeler İngilizce’ye göre alfabetik olarak sıralanmalıdır. Her anahtar kelime arasına (,) işareti konulup, sonuncu anahtar kelimedenden sonra (.) işareti konulmalıdır.

Üçüncü Sayfa: Makale üçüncü sayfadan itibaren “GİRİŞ”, “MATERYAL ve METOT”, “BULGULAR”, “TARTIŞMA ve SONUÇ” ve “KAYNAKLAR” bölümleri halinde tamamlanmalıdır. Bulgular ve tartışma birlikte verilebilir. Gerekli olduğu takdirde, teşekkür de eklenebilir. Bölüm başlıkları büyük harflerle yazılmalıdır. Bölümlere ait alt başlıklar yalnız ilk harfleri büyük olacak şekilde yazılmalıdır. Tüm başlıklar koyu tonda ve 12 punto ile satırbaşı hizasında yazılmalıdır.

İstatistiksel Analiz bilgileri: makalenin MATERYAL ve METOT bölümünün sonunda “İstatistiksel Analiz” başlığı altında verilmelidir.

Birimler ve Kısaltmalar: Her bir kısaltmanın açılımı metinde ilk geçtiği yerde verilmelidir. Birimler ve ölçülerde Uluslararası Standart birimleri (SI-sistem) kullanılmalıdır. Cins ve tür isimleri italik olarak yazılmalıdır. Makale içerisinde kullanılan rakamsal ve istatistiksel verilerde nokta kullanılmalıdır (örnek: 44.5; 0.82; % 97.7; $P < 0.01$ vb.).

Tablo ve Şekiller: Tablo ve Şekiller ana dökümandan ayrı olarak gönderilmelidir. Tablolar Dikey sayfa olanlar genişlik 7 cm’ye sığacak şekilde en fazla 35 satır, yatay sayfaya 15 cm’ye sığacak şekilde en fazla 25 satır olmalıdır. Şekiller bulanık olmayacak şekilde, jpeg, tiff, bmp veya gif formatında ve en az 150 dpi çözünürlükte hazırlanmalı, şekil üzerine yazılan yazılar ve işaretlemeler aynı şekilde resim işleme programlarında (Photoshop, paint vs.) “Calibri” fontu ile 12 puntoyu geçmemesi gerekmektedir. Grafikler resim formatında değil doc, docx, xls veyaxlsx formatında hazırlanmalıdır. Şekil, grafik, fotoğraf ve resimler başlıklarda ve metin içerisinde Şekil olarak ifade edilmelidir. Şekil ve tablolar metin içerisindeki sırasına göre numaralandırılmalı ve metin içerisinde kısaltılmadan yazılmalıdır (Örn; Şekil 1, Tablo 1). Tablo ve şekillerin başlık ve açıklamaları hem Türkçe hemde İngilizce olarak eklenmelidir. Tablo ve şekillerde kullanılan her türlü kısaltma tablo ve şekil altında açıklanmalıdır.

Sonuç: Makaleye ait elde edilen/varılan sonuç, “TARTIŞMA ve SONUÇ” kısmının sonunda “sonuç olarak...” ifadesiyle başlayan tek bir paragrafla belirtilmelidir.

Olgu Sunumları İçin:

Birinci ve ikinci sayfalar orijinal bilimsel araştırma makaleleri kısmında anlatıldığı şekilde hazırlanmalıdır. Özetlerde kullanılacak kelime sayısı 120’den daha az olmamalı ve tek satır aralıklarla yazılmalıdır.

Üçüncü sayfadan itibaren “GİRİŞ”, “OLGU SUNUMU” (olgu sunumu başlığı altında materyal, metot ve bulgulardan bahsedilmelidir) “TARTIŞMA ve SONUÇ” ve “KAYNAKLAR” şeklinde tamamlanmalıdır.

Olgu sunumu içerisinde eğer varsa İstatistiksel analiz bilgileri, birimler ve kısaltmalar, tablo ve şekiller bilimsel araştırma makaleleri kısmında anlatıldığı şekilde sunulmalıdır.

Olgu sunumuna ait elde edilen/varılan sonuç, “TARTIŞMA ve SONUÇ” kısmının sonunda “sonuç olarak...” ifadesiyle başlayan tek bir paragrafla belirtilmelidir.

Derlemeler İçin:

Birinci ve ikinci sayfalar orijinal bilimsel araştırma makaleleri kısmında anlatıldığı şekilde hazırlanmalıdır. Derlemeler için hazırlanan özet derlemenin konusu hakkında bilgi ve derlemenin amacından oluşmalıdır. Özetlerde kullanılacak kelime sayısı 170-200 arasında olmalıdır ve tek satır aralıklarla yazılmalıdır.

Derleme üçüncü sayfadan itibaren GİRİŞ ile başlamalı, yazar/lar tarafından belirlenecek ara başlıklarla devam etmeli, SONUÇ ve KAYNAKLAR ile tamamlanmalıdır.

Derleme içerisinde eğer varsa birimler ve kısaltmalar, tablo ve şekiller bilimsel araştırma makaleleri kısmında anlatıldığı şekilde sunulmalıdır.

Derlemeye ait sonuç, KAYNAKLAR bölümünden hemen önce SONUÇ başlığı altında belirtilmelidir.

Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi’ne yayımlanmak üzere gönderilen derlemenin sorumlu yazarının derlemenin konusu ile ilgili en az 3 (üç) adet makalesinin olması gerekmektedir. Sorumlu yazar, derlemesini gönderirken konu ile ilgili makalelerinin de künye bilgilerini dergi editörlüğüne göndermelidir (makale künyeleri, makale metninin en son sayfasında sunulmalıdır)

Kaynaklar

Kullanılan kaynak sayısı olgu sunumları için 10’dan az, araştırma makaleleri için 20’den az ve tüm makale türleri için 45’den fazla olmamalıdır.

Makale türü ne olursa olsun (orijinal araştırma makalesi, olgu sunumu, derleme) kullanılan kaynakların (makalenin gönderildiği yıl baz alınarak) en az beşte birlik kısmı son 3 yıla ait olmalıdır.

Makale türü ne olursa olsun (orijinal araştırma makalesi, olgu sunumu, derleme) kaynaklar aşağıda belirtildiği şekilde sunulmalıdır:

Metin içerisinde:

Metin içerisinde kaynaklara 1’den başlamak üzere numara verilmelidir ve bu numaralar (1), (1,2), (1,4-7,13) şeklinde parantez içerisinde belirtilmelidir. Yazar isminin kullanılacağı yerlerde ise yazarın soyadı ve parantez içerisinde kaynağın numarası Aktaş (22), Aktaş ve ark. (13) örneklerinde olduğu gibi yazılmalıdır.

Kaynaklar Bölümünde:

Metin içerisinde numaralandırılan kaynaklar, makalenin kaynaklar bölümünde numaralarına göre sıralandırılmalıdır.

Kaynak verilen bilimsel dergilerin isimlerinin yazılmasında derginin isminin kısaltması kullanılmalıdır.

Kaynak makale ise; Barbour AH., Rampling A., Hormaeche CE., 2001. Variation in the infectivity of *Listeria monocytogenes* isolates following intragastric inoculation of mice. *Infect Immun*, 69, 4657-4660.

Kaynak kitap ise; Lawrie RA., 2002. *Lawrie Meat Science*. 6th ed., 330-335, Woodhead Publication, Cambridge.

Kaynak kitapta bir bölüm ise; Mark E., 1989. Thyroid diseases. In "Textbook of Veterinary Internal Medicine", Ed., SJ Ettinger, 6th ed., 230-250, W.B. Saunders Company, Philadelphia.

Kaynak bir tez ise; Aktaş MS., 2005. Köpeklerde antibiyotiklerin neden olduğu ishallerde probiyotiklerden *Saccharomyces boulardii*'nin etkisi. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.

Kaynak bir kuruluşun yayını ise; FAWC, 1991. Report on the european commission proposals on the transport of animals. London, MAFF Publication.

Kaynak bir yazılım ise; SAS, 1990. SAS user's guide: Statistics, 4th ed., Sas Institute, Cary.

Web tabanlı kaynaklar kullanılmamalıdır.

MAKALENİN GÖNDERİLMESİ

Makale online sistem (<http://dergipark.gov.tr/ataunivbd>) aracılığıyla dergi editörlüğüne gönderilmelidir.

DERGİ BASKISI

Baskı aşamasında olan çalışmalar en kısa sürede dergimize ait WEB alanına eklenecektir.

Kabul edilen çalışmalar **ücretsiz** basılacaktır.

Yazarlara ayrı baskı gönderilmeyecektir.

Sorumlu yazara makalenin basıldığı sayıdan bir örnek ücretsiz olarak gönderilir.

Bu yazım kuralları, Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi Yayın Kurulu

tarafından revize edilmiştir. 01.05.2017 tarihinden sonra gönderilecek makaleler bu

kurallara tabidir.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

1. Atatürk University Journal of Veterinary Sciences is a refereed scientific publication organ of Atatürk University Faculty of Veterinary Sciences and is published tri-annually in April, October and December. The abbreviation of the journal's title is "Atatürk University J. Vet. Sci."

2. Original research papers, case reports and invited or Editor-approved reviews to be submitted should be prepared either in Turkish or in English, must not be published elsewhere or submitted concomitantly to any other journal, within the scope of Veterinary Medicine and relevant Departments, i.e. Basic Veterinary Sciences (Anatomy, Biochemistry, Physiology, Histology, Occupational/Professional Ethics and Deontology), Preclinical Veterinary Sciences (Pharmacology and Toxicology, Microbiology, Parasitology, Pathology, Virology), Clinical Veterinary Sciences (Surgery, Internal Medicine, Obstetrics and Gynecology, Reproduction and Artificial Insemination), Animal Science and Nutritional Sciences (Biostatistics, Genetics, Animal Nutrition and Nutritional Disorders, Animal Enterprises Economy, Animal Science), Animal-Originated Food Hygiene and Technology, with, exotic animal science and laboratory animals, are published in this journal.

3. Ethics committee approval, institution, and approval number are required for the article sent to Atatürk University Journal of Veterinary Sciences for publication must be specified in the Material and Method section of the article. The editorial board may also request an ethics committee approval document when deemed necessary. In the articles summarized from the thesis studies, the decision of the ethics committee is not required.

4. Authors are responsible for complying with the copyright conditions related with the material cited (taken) from other resources or used and signing the agreement contract declaring transfer of the copyright to the journal. The full responsibility of the texts to be appeared within the journal belongs to the author(s).

5. Manuscripts to be considered are sent to the two referees at least. Acceptance of the manuscripts depends on both suggestion of the referees and final decision of the Editorial Board.

6. The responsible author has to send the "Article Check List" along with the article to be sent to Atatürk University Journal of Veterinary Sciences for publication.

7. Article and article check list reaching Atatürk University Journal of Veterinary Sciences Editor is subject to preliminary evaluation by a journal editor. The editorial has the right to refuse the article according to the preliminary evaluation result or to request a correction before subjecting it to the referee evaluation.

MANUSCRIPT PREPARATION

1. Manuscripts should be written in A4-sized paper (one-sided), double-spaced, with 3 cm space from the margins of the paper and should not exceed 16 pages for original scientific researches and reviews or 5 pages for short scientific studies such as case reports.

2. Manuscript should be prepared using Microsoft Word 6.0 or upper versions, in Calibri characters with 12 point typing size.

3. Line numbers (be started from the 2nd page onwards) and page numbers (at the middle of the bottom of the page) should be given in the manuscript.

4. Details (thesis, project, etc.) related with the manuscripts should be given at the end of the title of the manuscript with the sign of superscript (*) with further explanation below the title in italic format.

5. Trademarks of substances (materials) and products of the subject of the study should not be used.

For Research Articles:

First page: The first page of the manuscript should contain title, authors' name-surname and addresses, e-mail addresses of the authors, corresponding authors' explanatory details related with the manuscripts, if any.

Title: Titles in Turkish and English should be written in small letters with only the first letter to be in capital. In case of the Turkish language of the main text, firstly titles in Turkish then in English should be given, while the opposite should be given for manuscripts written in English.

Names of authors and addresses: The first letters of name and surnames (without academic titles) of author(s) should be written in capital and aligned at the middle below the title. Corresponding author (*) should be pointed, a value should be added as a superscript at the right and these values should be used in the section of addresses. In that section, the body/authority, unit/department, city and country of the authors should be described.

E-mail addresses of the authors: All the names and e-mail addresses of authors mentioned within the manuscript should be written.

Contact details of the corresponding author: The name-surname, e-mail, address, phone, mobile and fax numbers of the corresponding author should be written.

Explanatory details of the manuscripts: If any, the explanatory details (thesis, project, etc.) should be written in *italic* letters at the end of the first page.

Second page: The second page of the manuscript should contain summary in Turkish and English with key words each. If the language of the main text is in Turkish, the summary and the key words should first be in Turkish while the opposite should be given for those manuscripts written in English.

Summary: Briefly, it should contain the aim, material, method, results and conclusions. The number of word to be used should be between 170-200 words and be written in single-space.

Key words: The number should be 5 at maximum in the alphabetic order of the language used either in Turkish or in English. Between each of the words, a comma (,) sign should be put while a full stop (.) sign should be put at the end of the last one.

Third page: From this page onwards, the manuscript should continue with the sections of INTRODUCTION, MATERIALS and METHODS, RESULTS, DISCUSSION and CONCLUSION and REFERENCES in the following order. The sections of results and discussion may be given together. A section of acknowledgement may also be added, if needed. Section titles should be written in capital letters. Sub-headings of the sections should be written with the first letters in capital only and aligned with the beginning of paragraph. All the headings should be written in black 12-point typing-size and aligned with the beginning of paragraph.

Data from Statistical analyses: This section should be given at the end of MATERIALS and METHODS section and under the title of “Statistical Analysis”.

Units and Abbreviations: The meaning of each abbreviation should be given where it appears first. For units and measurements, International Standard units (SI-system) should be used. The names of genus (breeds) and species should be written in italic style. For numerical and statistical values, full stop (.) sign should be used (e.g. 44.5; 0.82; 97.7 %; $P < 0.01$, etc.).

Tables and Figures: Figures, graphics, photos and pictures/plates within the headings and text should all be given as Figure. Figures and tables should be numbered according to their orders within the text and written without any abbreviation within the paragraph (e.g. Figure 1, Table 1). Tables and figures should be placed into the sections appropriately, and their headings and explanations should also be included in Turkish and English. All types of abbreviations used within tables and figures should be explained below them.

Conclusion: The ultimate result obtained should be described as “In conclusion,...” in a single paragraph at the end of DISCUSSION and CONCLUSION section.

For Case Reports:

The first and second pages should be prepared according to details given for the scientific research manuscripts. The number of words to be used in summary should not be less than 120 words and be written in single-spaced type.

From the third page onwards, INTRODUCTION, CASE REPORT (materials, methods and results should be mentioned under the title of case report) should be followed by DISCUSSION and CONCLUSION and REFERENCES.

If any, data from the statistical analysis, units and abbreviations, tables and figures should be presented as given for scientific research manuscripts.

For case report, the ultimate result obtained should be described as “In conclusion,...” in a single paragraph at the end of DISCUSSION and CONCLUSION section.

For Reviews:

The first and second pages of reviews should be prepared according to details given for the scientific research manuscripts. The summary should involve data on the subject and aim of the review. The number of words used in summary should be between 170-200 words and be written in single-spaced type.

From the third page onwards, reviews should start with introduction, continue with subheadings to be determined by the author(s) and be completed with CONCLUSION and REFERENCES.

If any, the units and abbreviations, tables and figures within the review should be presented as given for scientific research manuscripts.

For reviews, the ultimate result should be described as CONCLUSION section in a single paragraph just before the section for REFERENCES.

The corresponding author of the compilation sent to the Atatürk University Journal of Veterinary Sciences for publication must have at least 3 articles on the subject of the compilation. The corresponding author must send the citation information of relevant articles related to the subject along with his/ her article (relevant article citations must be presented on the last page of the article)

References

The number of resources used must not be less than 10 for case reports, less than 20 for research articles, and more than 45 for all article types.

Regardless of the type of article (original research article, case report, compilation), at least one-fifth of the resources used (based on the year the article was submitted) must belong to the last three years.

Regardless of the type of manuscript (original research paper, case report, review), references should be given, as follows:

For Text section:

Within the text, reference numbers should be given as numbers starting from 1, and these numbers should be indicated within the brackets as (1), (1,2), and/or (1,4-7,13). Where the name of the author is to be given, the surname of the author and reference number should be written as Aktas (22), and/or Aktas et al. (13).

For References section:

The references given within the text should be given as numbers in numerical order within the reference section.

For writing the scientific journals, its international title recommended by the journal should be used. The journal title abbreviation must not be used.

For manuscripts; Barbour AH., Rampling A., Hormaeche CE., 2001. Variation in the infectivity of *Listeria monocytogenes* isolates following intragastric inoculation of mice. *Infection and Immunity*, 69, 4657-4660.

For books; Lawrie RA., 2002. *Lawrie Meat Science*. 6th edn., 330-335, Woodhead Publication, Cambridge.

For chapters of a book; Mark E., 1989. Thyroid diseases. In “Textbook of Veterinary Internal Medicine”, Ed., SJ Ettinger, 6th edn., 230-250, W.B. Saunders Co., Philadelphia.

For theses; Aktas MS., 2005. Efficacy of *Saccharomyces Boulardii* as a probiotic in Dogs with lincomycin induced diarrhoea. Ankara University, Graduate School Health Science, Turkey.

For publications of a Foundation; FAWC, 1991. Report on the european commission proposals on the transport of animals. London, MAFF Publication.

For softwares; SAS, 1990. SAS user’s guide: Statistics, 4th edn., SAS Institute, Cary.

Web-based references should not be used.

MANUSCRIPT SUBMISSION

The article must be sent to the journal editor through online system (<http://dergipark.ulakbim.gov.tr/ataunivbd/>).The file names of original manuscripts and tables should involve a “.doc” extension.

Figures (graphs, photos, figures and pictures/plates) should be submitted, as a separate file, in JPEG format with 300 DPI resolutions.

JOURNAL’S PRESS

Articles in press will be added into the web page of the journal immediately.

Articles accepted for publication will be published free of charge.

No offprints will be sent to the authors.

A copy of the issue of the journal with the article is sent for free to the corresponding author of the article.

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ VETERİNER BİLİMLERİ DERGİSİ

YAYIN HAKLARI DEVRİ SÖZLEŞMESİ

Makale Türü: () Araştırma () Derleme () Olgu Sunumu () Diğer

Makale Başlığı:.....

.....

Biz türü ve başlığı yukarıda belirtilmiş makalenin yazarları olarak; Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi yazım ve yayın şartlarını bilerek ve kabul ederek hazırlayıp yayımlanması dileğiyle Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi Editörlüğüne gönderdiğimiz makalenin orijinal olduğunu, kısmen veya tamamen daha önce yayımlanmadığını veya eşzamanlı olarak başka bir yayın kuruluşuna gönderilmediğini, makale yayımlandıktan sonra ortaya çıkabilecek her türlü bilimsel ve etik sorumluluğun bize ait olduğunu ve Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi'nin hiçbir sorumluluk taşımayacağını, danışman ve dergi editörü tarafından gerekli görülen düzeltmelerle birlikte her türlü yayın hakkını, yazının yayımlandığı tarihten itibaren Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi'ne devrettiğimizi taahhüt ederiz.

Bununla birlikte yazarların telif hakkı dışında kalan patent vb. tescil edilmiş hakları, yazarların kitap ve dersler gibi çalışmalarında makalenin tümü ya da bir bölümünü ücret ödemeksizin kullanım hakkı, ticari amaçla kullanmamak üzere makaleyi çoğaltma hakkı saklıdır.

Yazarın Adı ve Soyadı (Makaledeki İsim Sırasına Göre)	İmza	Tarih
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		

Sorumlu Yazar

Adı ve Soyadı:

Adres:

Telefon/Fax:

E-posta:

Tarih:.....İmza:.....

Not: Lütfen formu doldurduktan sonra e-posta adreslerimizden herhangi birine gönderiniz.

DERGİ ADRESİ

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veteriner Bilimleri Dergisi Editörlüğü, 25240 Kampüs/ERZURUM-TÜRKİYE

Tel: +90 442 231 7222, Fax: +90 0442 2317244, E-posta: vetdergisi@atauni.edu.tr/ atavetderg@atauni.edu.tr

ATATÜRK UNIVERSITY JOURNAL OF VETERINARY SCIENCES

COPYRIGHT DECLARATION FORM

Type of Manuscript: () Research () Review () Case Report () Other

Title of Manuscript:.....
.....

We, as the authors of manuscript having type and title aforegiven, declare that; i) this manuscript submitted to The Editor of Atatürk University Journal of Veterinary Sciences for publication, as prepared in complying with the instructions for authors, is original, ii), it has not been published partially or totally or submitted synchronously to other publishing body, iii) all the possible scientific and ethical responsibilities, without any further responsibility of The Journal of Ataturk University Veterinary Sciences at all, following the publication of manuscript are belong to us, iv) we transfer all the copyrights along with the corrections recommended by the advisor and Editor to The Journal of Ataturk University Veterinary Sciences following the date of publication of the manuscript.

However, other than the copyright conditions described; i) the authenticated rights (such as patent), ii) the right of use of the manuscript, totally or partially, for scientific activities such as books and lectures, with no charge and iii) dissemination of the manuscript by the authors without commercial purposes are all reserved.

**Name and Surname of the author
(in the manuscript's order)**

Signature

Date

1
2
3
4
5
6
7
8

Corresponding Author

Name and Surname:

Address:

Phone/Fax:

E-mail:

Date:.....

Signature:.....

Note: Please send the form to either of our e-mail addresses after filling in the blanks.

JOURNAL'S ADDRESS

Atatürk University Faculty of Veterinary Sciences, The Editor of Atatürk University J. Vet. Sci., 25240-Campus/Erzurum-TURKEY
Phone: +90 442 2317222, Fax: +90 0442 2317244, E-mail: vetdergisi@atauni.edu.tr or atavetderg@atauni.edu.tr

- **Vural DENİZHAN, Süleyman KOZAT, Cumali ÖZKAN, Selçuk Seçkin TUNCER.** Evaluation of Serum Cobalt, Copper, Iron, Calcium, Phosphorus and Magnesium Concentrations in Cattle Naturally Infected with *Theileria annulata* (*Theileria annulata* ile Doğal Enfekte Sığırlarda Serum Kobalt, Bakır, Demir, Kalsiyum, Fosfor ve Magnezyum Konsantrasyonlarının Değerlendirilmesi) 111-117
- **Ali Evren HAYDARDEDEOĞLU, Buğrahan Bekir YAĞCI, Kerem URAL, Hasan GÜZELBEKTEŞ.** Stress Responses of Stallions during Transport Period: The variations of Complete Blood Count and Serum Biochemistry (*Uzun Transporta Bağlı Aygırların Strese Tepkileri: Tam kan sayımı ve Serum Biyokimya Varyasyonları*) 118-123
- **Latif Emrah YANMAZ, Elif DOĞAN, Zafer OKUMUŞ, Mümin Gökhan ŞENOCAK, Uğur ERSÖZ, Sıtkıcan OKUR.** Comparison of Intranasal and Intramuscular Administration of Zolazepam-Tiletamine Combination in Cats (*Kedilerde Intranasal ve Intramusküler Zolazepam-Tiletamine Kombinasyonu Uygulamasının Karşılaştırılması*) 124-129
- **Emin ŞENGÜL, Fikret ÇELEBİ, Volkan GELEN, Ali ÇINAR.** The Effects of *Rosmarinus officinalis* (Rosemary) Aqueous Extract on Smooth Muscle Contractions in Isolated Rat Urinary Bladder (*İzole Edilmiş Rat Mesane Düz Kas Kontraksiyonları Üzerine Rosmarinus officinalis* (Rosemary) Aköz Ekstraktının Etkileri) 130-136
- **Ebru ÇETİN.** Sıçanlarda Karbon Tetraklorürün (CCl₄) Neden Olduğu Koagülasyon Bozukluklarında Etil Pirüvatın Etkisi (*Effect of Ethyl Pyruvate on Carbon Tetrachloride (CCl₄)-Induced Coagulation Disturbances in Rats*) 137-142
- **Nadide Nabil KAMİLOĞLU, Yeliz KOLAY.** L-Name Hipertansif Ratlarda Ace İnhibitörü ile Birlikte L-Karnitin ve Co-Enzim Q₁₀ Verilmesinin Total Oksidan ve Antioksidan Düzeyleri Üzerine Etkileri (*Effects of L-Carnitine and Co-enzyme Q₁₀ Together with ACE Inhibitors on Total Oxidant and Antioxidant Levels in L-Name Hypertensive Rats*) 143-151
- **Ayşe KILIÇ.** Koyun ve Keçi Sütlerinde *Coxiella burnetii* Varlığının PCR ile Araştırılması (*The Investigation of Presence Coxiella burnetii in Sheep and Goat Milk by the PCR*) 152-156
- **M.Kuddusi ERHAN, Ş.Canan BÖLÜKBAŞI AKTAŞ.** Narenciye Kabuk Yağlarının Etlik Piliçlerde Doku Yağ Asidi Kompozisyonu ve Raf Ömrü Üzerine Etkileri (*The Effects of Citrus Peel Oils on Fatty Acid Composition and Shelf Life of Muscle in Broilers*) 157-166
- **Fatih Mehmet KANDEMİR, Sefa KÜÇÜKLER, Cüneyt ÇAĞLAYAN.** Ratlarda Methotrexate Kaynaklı Karaciğer Toksisitesine Karşı Silymarin ve Naringin'in Yararlı Etkileri (*Beneficial Effects of Silymarin and Naringin Against Methotrexate-induced Hepatotoxicity in Rats*) 167-177
- **Serkan YILDIRIM.** Ratlarda Karbon Tetraklorür ile İndüklenen Karaciğer Toksikasyonu Üzerine Resveratrol'ün Koruyucu Etkisinin Histopatolojik ve TUNEL Metodu ile Araştırılması (*Investigation by Histopathological and TUNEL Method of the Protective Effect of Resveratrol on Carbon Tetrachloride Induced Liver Toxicity in Rats*) 178-186
- **Serpil KILIÇ, Fikret KARATAŞ.** Van Kedisi Eritrositi'nden 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz Enzimi (E.C. 1.1.1.44)'nin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Kinetik Özellikleri (*Purification, Characterisation and Kinetic Properties of 6-Phosphogluconate Dehydrogenase Enzyme (E.C. 1.1.1.44) from the Van Cat Erythrocyte*) 187-194

Olgu Sunumları / Case Reports

- **Zafer USTA, Ottmar DISTL.** Atresia Ani, Hypospadias and Rudimentary External Genitalia in Two German Holstein Calves (*İki Alman Holştayn Buzağında Atresia Ani, Hypospadias ve Gelişmemiş Dış Genital Organlar Olgusu*) 195-202

Derlemeler / Reviews

- **Duygu SEZER, Özlem GÜZEL.** Kaplumbağalarda Endoskopi Uygulamaları (*Endoscopic Applications in Turtles*) 203-209
- **Süleyman KOZAT.** Sıvı Tedavisinde Koloidal Solüsyonların Önemi (*Importance of Colloidal Solutions in Fluid Treatment*) 210-217
- **Kemal Kaan TEKİNŞEN, Daniş AKAR.** Erzincan Tulum Peyniri (*Erzincan Tulum Cheese*) 218-226