



Official Publication of
The Afyon Kocatepe University
Faculty of Veterinary Medicine

K o c a t e p e Veterinary Journal

2018, 11 (2), June



ISSN: 1308-1594
e-ISSN: 2147-6853

<http://www.kvj.aku.edu.tr>

DergiPark
AKADEMİK

ADVISORY BOARDS

Publisher

Prof. Dr. Erkan KARADAŞ
Dean
On behalf of Afyon Kocatepe University
Faculty of Veterinary Medicine
Afyonkarahisar - TURKEY

Editor in Chief

Prof. Dr. Esmâ KOZAN

Editors

Assoc. Prof. Dr. Musa KORKMAZ
Assist. Prof. Dr. Recep KARA

Organising Committee

Assoc. Prof. Dr. Mine DOŞAY AKBULUT
Assoc. Prof. Dr. C. Çağrı ÇINGİ
Assoc. Prof. Dr. İbrahim KILIÇ
Assist. Prof. Dr. Murat TANDOĞAN
Assist. Prof. Dr. Ulaş ACARÖZ

Prof. Dr. Arif Altuntaş	Ankara University -Turkey
Prof. Dr. Atilla Şimşek	Selçuk University-Turkey
Prof. Dr. Cevdet Uğuz	Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. Yavuz O. Birdane	Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. İbrahim Demirkan	Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. İlhami Çelik	Selçuk University-Turkey
Prof. Dr. İsmail Bayram	Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. Abdullah Kaya	Selçuk University-Turkey
Prof. Dr. Mustafa Alisharlı	Ondokuz Mayıs University-Turkey
Prof. Dr. Nalan Baysu Sözbilir	Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. Recep Aslan	Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. Seyfullah Haliloğlu	Selçuk University-Turkey
Prof. Dr. Yahya Kuyucuoğlu	Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. Zafer Karaer	Ankara University-Turkey
Prof. Dr. Zehra Bozkurt	Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. İbrahim Taşal	Mehmet Akif Ersoy University-Turkey
Prof. Dr. Şule Kaya	Mehmet Akif Ersoy University-Turkey
Prof. Dr. Korhan Altunbaş	Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. Aysun Demirkan	Afyon Kocatepe University-Turkey
Assoc. Prof. Dr. Fatih M. Birdane	Afyon Kocatepe University-Turkey
Assoc. Prof. Dr. Süleyman Aypak	Adnan Menderes University-Turkey
Assoc. Prof. Dr. Hasan Çiçek	Afyon Kocatepe University-Turkey
Assoc. Prof. Dr. Oktay Yılmaz	Afyon Kocatepe University-Turkey
Assoc. Prof. Dr. İbrahim Kılıç	Afyon Kocatepe University-Turkey
Assoc. Prof. Dr. Zeki Gürler	Afyon Kocatepe University-Turkey
Assist. Prof. Dr. M. Fatih Bozkurt	Afyon Kocatepe University-Turkey

Kocatepe Veterinary Journal is International an Peer-Reviewed Journal and published four times a year.

Kocatepe Veterinary Journal;
indexed in TUBİTAK-ULAKBİM TR-Disin Journal Index, Academic Index, Turkey Citation Index, Index Copernicus, SIS (Scientific Indexing Services), Google Scholar

Addressed:

Kocatepe Veterinary Journal, Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, 03200, Afyonkarahisar, TURKEY.

Tel: +90 272 214 9309 Fax: +90 272 214 9309 E-mail: kvj@aku.edu.tr

www.kvj.aku.edu.tr <http://dergipark.gov.tr/kvj>

Only accepts online submission

RESEARCH ARTICLES

- CXC Chemokine Ligand 12 and G Protein-Coupled Receptor 30 Expressions in Canine Mammary Tumors of Mixed Origin** (*Mixed Orjinli Köpek Meme Tümörlerinde CXC Chemokine Ligand 12 ve G Protein Coupled Receptor 30 Ekspresyonları*) 104-112
Mehmet Eray ALCIGIR, Elvan ANADOL, Nilgun GULTIKEN, Kubra KARAKAS ALKAN, Hasan ALKAN, Halit KANCA
- Presence of Beta-Lactam Antibiotic Residues in Raw Milk Obtained From Afyonkarahisar Province** (*Afyonkarahisar Bölgesinden Toplanan Çiğ Sütlerde Beta-Laktam Grubu Antibiyotik Kalıntı Varlığının Araştırılması*) 113-118
Eda AYCAN, Sinan INCE
- Niğde İlindeki Çiğ Koyun, Keçi ve İnek Sütlerinde Aflatoxin M1 Düzeyleri** (*Aflatoxin M1 Levels In Raw Sheep, Goat And Cow Milks In Niğde Province*) 119-125
Fulden KARADAL, Nurhan ERTAS ONMAZ, Harun HIZLISOY, Yeliz YILDIRIM, Serhat AL, Zafer GONULALAN
- Merinos Koçlarda Spermaya Katılan Antioksidanların Kısa Süreli Saklama Sırasında Spermatolojik Parametreler ve DNA Hasarı Üzerine Etkileri** (*The Effects of Antioxidants Supplementation on Spermatological Parameters and DNA Damage in Liquid Storage Process in Merinos Ram Semen*) 126-133
Fatih AVDATEK, Deniz YENİ, Mustafa GÜNDOĞAN
- Effects of Usage of Sepiolite in Layer Diet on Pellet Quality and Pellet Production Parameters** (*Yumurta Tavuğu Yemlerinde Sepiyolit Kullanımının Pelet Kalitesi ve Pelet Üretim Parametrelerine Etkisi*) 134-139
Sakine YALÇIN, Sadık ÇIVRACI, Ender BURÇAK, İlyas ONBAŞILAR
- Gentamisin Verilen Sıçanlara Bor Uygulamasının Hematolojik Parametre Düzeylerine Etkileri** (*Effects of Boron Administration on Hematological Parameters in Rats Given Gentamicin*) 140-147
İbrahim DURMUŞ, Sinan İNCE, Mehmet Naci SALİM, Abdullah ERYAVUZ, İsmail KÜÇÜKKURT
- Ramlıç ve Dağlıç Koyunlarda Kırkım Sonu Canlı Ağırlık, Yapağı Verimi ve Özellikleri** (*Body Weight After Shearing, Greasy Fleece Weight and Some Fleece Traits of Ramlıç and Dağlıç Sheep*) 148-155
Özge BAĞKESEN, Serdar KOÇAK
- The Levels of Some Biochemical Parameters in Anatolian Buffaloes With Trichophytosis** (*Trikofitozisli Anadolu Mandalarında Bazı Biyokimyasal Parametrelerin Seviyeleri*) 156-159
Mustafa KABU, Halit Buğra KOCA
- Kırklareli Yöresi Süt Sığırlarında Subklinik Paratüberkülozun Seroprevalansı** (*Seroprevalence of Subclinical Paratuberculosis in Dairy Cattle in Kırklareli Region*) 160-164
Banu KARAKAŞ, Turan CİVELEK
- Endosülfan ve C Vitamini Uygulamalarının Erkek Yeni Zellanda Tavşanları Üzerindeki Etkisi** (*Effects of Vitamin C on Male New Zealand White Rabbits Exposed to Endosulfan*) 165-172
Özlem YILDIZ GÜLAY, Tülay BÜYÜKOĞLU, Fatma Şefika HATİPOĞLU, Mehmet Şükrü GÜLAY
- Honamlı Keçisi ve Kıl Keçisi (Karakeçi) Kılları Üzerinde Morfolojik İncelemeler** (*Morphological Investigations on The Hairs of The Honamlı Goat and The Hair Goat (Black Goat)*) 173-179
İmdat ORHAN, Ayhan DÜZLER, Aydın ALAN, Özkan ELMAZ, Özcan ÖZGEL
- Afyonkarahisar'dan Toplanan Çiğ Manda Sütlerinde Salmonella spp. Varlığının Araştırılması** (*An investigation on the Presence of Salmonella spp. in Raw Water Buffalo Milk collected from Afyonkarahisar Province*) 180-185
Ulaş ACARÖZ, Recep KARA, Zeki GÜRLER, Damla ARSLAN-ACARÖZ, Fahriye ZEMHERİ
- Süt İneklerinde Görülen Subklinik ve Kinik Ketozisin Bazı Hematolojik Parametreler, Mastitis Metritis İnsidensleri ile Sürü Dışı Kalma Oranına Etkileri** (*Effects of Subclinical and Clinical Ketosis on The Incidence of Mastitis, Metritis, Culling Rate and Some Hematological Parameters in Dairy Cows*) 186-193
Cangir UYARLAR, İbrahim Sadı ÇETİNGÜL, Eyüp Eren GÜLTEPE, Abdur Rahman SİAL, İsmail BAYRAM

SHORT COMMUNICATION

- Gastrointestinal Helminth Infections in Dogs Detected by Stool Examination in Isparta Province** (*Isparta İlinde Sabıplı Köpeklerde Dışkı Bakışı ile Tespit Edilen Gastrointestinal Helminth Enfeksiyonları*) 194-198
Mehmet ACIÖZ, Ahmet GÖKSU, Mahmut Sinan EREZ

CASE REPORT

- Afyonkarahisar'da Bir Keçide Sekonder Enfeksiyonlarla Birlikte Seyreden Koksidiyosis Olgusu** (*Mortality Associated With Coccidiosis and Secondary Infections in A Goat in Afyonkarahisar*) 199-202
Ahmet GÖKSU, M.Fatih BOZKURT, Hatice ÇİÇEK, M.Sinan EREZ, D.Fatih BAŞER

CXC Chemokine Ligand 12 and G Protein-Coupled Receptor 30 Expressions in Canine Mammary Tumors of Mixed Origin

Mehmet Eray ALCIGIR*¹, Elvan ANADOL², Nilgun GULTIKEN³, Kubra KARAKAS ALKAN⁴, Hasan ALKAN⁵, Halit KANCA⁴

¹ Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University, Dışkapı, Ankara, Turkey

² Gazi University Laboratory Animal Breeding and Experimental Research Center, Faculty of Medicine, Gazi University, Beşevler, Ankara, Turkey

³ Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Veterinary Medicine, Ondokuzmayıs University, Kurupelit, Samsun, Turkey

⁴ Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University, Dışkapı, Ankara, Turkey

⁵ Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Veterinary Medicine, Selçuk University, Konya, Turkey

*Corresponding author e-mail: erayalcigir@gmail.com

ABSTRACT

Canine mammary tumors (CMT) included complex interactions in the etiopathogenesis. It is the most common problem of neoplasia in female dogs. The aim of this study was to reveal the roles of chemokine CXC Ligand 12 (CXCL12) and G protein coupled receptor 30 (GPCR30) expressions in the inflammatory process and neoplastic development in canine mammary glands. Therefore, after clinical and pathomorphological evaluation, 18 cases of mixed origin malignant forms (mixed-type carcinoma-n=6, complex-type carcinoma-n=3, carcinosarcoma-n=7, carcinoma and malignant myoepithelioma-n=2) were examined in the study. Inflammatory cells accompanying neoplastic changes, were determined to consist of predominantly neutrophils and leukocytes, followed by lymphocytes, plasma cells and macrophages. The CXCL12 and GPCR30 expressions were scored. immunohistochemically. Most of the expressions for both markers were moderate in the mammary gland and duct epithelial cells, myoepithelial cells and inflammatory cells. Fibrocytes and fibroblasts gave a mild reaction in general, and no reaction was found in the myxoid, chondroid and osteoid matrix. There was considered to be a close relationship between mixed composition CMT and subacute inflammation, and thus it was concluded that inflammatory cells may trigger or initiate neoplastic transformation in the cellular environment including differentiated cells of the mammary gland.

Key words: Chemoattractive cytokine, G protein, clinicopathology, mammary tumor, dog.

Mikst Orjinli Köpek Meme Tümörlerinde CXC Chemokine Ligand 12 ve G Protein Coupled Receptor 30 Ekspresyonları

ÖZ

Köpek meme tümörleri etiopatogenezinde karmaşık bir seri etkileşimleri içerir. Dişi köpeklerde en yaygın karşılaşılan problemdir. Bu çalışmada, köpek meme tümörlerinde yangısal süreç ve tümör gelişimde bir çeşit kemokin olan kemokine CXC Ligand 12 (CXCL12) ile G protein coupled receptor 30 (GPCR30) ekspresyonlarının rollerini ortaya koymak amaçlandı. Bu amaçla, klinik ve patomorfolojik değerlendirmeden sonra, malignant formda mikst orjinli 18 olgu (mixed-type carcinoma-n=6, complex-type carcinoma-n=3, carcinosarcoma-n=7, carcinoma and malignant myoepithelioma-n=2) çalışmaya dahil edildi. Neoplazik değişikliklere eşlik eden yangısal hücreler ağırlıklı olarak nötrofil lökosit ve sırasıyla lenfosit, plazma hücresi ile makrofajlardan oluşuyordu. İmmunohistokimyasal olarak CXCL12 ve GPCR30 ekspresyonları skorlandı. Her iki belirteçte ekspresyonların çoğu meme bezleri, duktal epitel hücreler, miyoepitel hücreleri ile yangısal hücrelerde orta şiddetteydi. Ancak, fibrosit ve fibroblastlarda genelde hafif şiddetteydi. Mikst orjinli köpek meme tümörleri ile subakut yangı arasında yakın bir ilişki olduğu düşünüldü. Ayrıca, yangısal hücrelerin meme bezlerinin farklılaşmasını içeren hücresel çevrenin bu mikst neoplazik dönüşümünü tetikleyebileceği veya başlatabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Şemoatraktif sitokin, G protein, klinikopatoloji, meme tümörü, köpek.

To cite this article: Alcigir E.M. Anadol E. Gultiken N. Alkan Karakas K. Alkan H. Kanca H. Cxc Chemokine Ligand 12 and G Protein-Coupled Receptor 30 Expressions In Canine Mammary Tumors Of Mixed Origin. Kocatepe Vet J. (2018) 11(2): 104-112.

INTRODUCTION

Canine mammary tumors (CMTs) are the most frequent neoplasms in intact female dogs (Egenvall et al., 2005). The tumors have an increasing incidence at approximately 6-7 years of age, although 10-11 years is also a potential risk for bitches (Priester, 1979; Boldizar et al., 1992; Misdorp, 1996; Moe, 2001; Egenvall et al., 2005). It has been reported that increased age, progestagen treatment or intact status may be related to an increased risk of mammary neoplasia in bitches (Perez-Alenza et al., 2000). Nearly half of CMTs are diagnosed as malignant (Misdorp et al., 1999) and tumors with malignant transformation constitute almost half of all mammary tumors in dogs (Perez-Alenza et al., 2000).

The prediction of clinical behavior in malignant mammary tumors is difficult because of the heterogeneous form in pathological aspects of clinical behavior (Perez-Alenza et al., 2000). These tumours exhibit a complex histological pattern because they comprise elements from the epithelium and the mesenchyma and have the capacity to undergo malignant transformation, thereby resulting in mainly carcinomas and less frequently carcinosarcomas and sarcomas in mixed tumours (Misdorp et al., 1999; Cassali et al., 2011). Chemokines are a superfamily of small molecule chemoattractive cytokines that regulate many cellular functions (Dewan et al., 2006). The CXC chemokine ligand (CXCL12) is expressed in a variety of cells, including stromal cells (fibroblasts and endothelial cells) (Muller et al., 2001; Salvucci et al., 2002). CXCL12 correlates with common sites of metastatic breast cancer (Crump et al., 1997). CXCL12 has linkage to CXCR4, which is known as a specific receptor for chemokines, and it activates several signal transductions in the cells. As a result of this mechanism, multiple effector molecules regulate cell survival, proliferation, chemotaxis, chemoinvasion, migration, and adhesion. In this regard, decreased stimulation in CXCR4 may create the development of neoplastic transformation and uncontrolled proliferation in the cells (Luker and Luker, 2006).

The biological effects of the chemokines are mediated by seven-transmembrane-domain receptors that constitute a subset of the G protein-coupled cell surface receptor (GPCR) superfamily (Zlotnik and Yoshie, 2000). Similar to the CXCL12-CXCR4 interaction, GPCRs, the largest family of cell-surface receptors, regulate cellular motility, growth and differentiation, all of which are understood to play an important role in the biology of cancer (Spiegelberg and Hamm, 2007). This regulation mechanism may trigger malignant

transformation of mammary or breast cells (Li et al., 2005; Dorsam and Gutkind, 2007). In addition, GPCRs, which are thought to be one of the main mediators in the inflammation process, have a potential correlation between subacute and chronic inflammations and malignant transformation in the cells (Dorsam and Gutkind, 2007).

The aim of the present study was to investigate interactions between CXCL-12 and GPCR30 expressions in mixed origin CMTs. It is hoped that this research will contribute to a better understanding of the biology of mixed origin CMTs.

MATERIALS and METHOD

Animals

The study was performed according to the principles outlined in decision no. 2014/8 of the Ethics Committee of Animal Research of Turkey.

The study included a total of 48 female dogs with the complaints of mammary masses that were submitted to the Obstetrics and Gynaecology Clinics of the Veterinary Faculties of the University of Ankara and Ondokuz Mayıs University. The ages of dogs ranged from 4 to 14 years. The dogs were of different breeds including mostly Terriers, German Shepherd, Pekingese, Cocker Spaniel, Kangal and mixed breeds. Clinical diagnosis was made of all the masses localized on the left or right mammary lines. Permission was obtained from the owner of each dog and the affected mammary lobes or affected mammary lines including masses were removed by regional mastectomy, unilateral or bilateral complete mastectomy depending on the clinical stage and the number of tumours in the mammary lobes.

After the operation, the mammary tissues with suspected neoplasia were sent to the Department of Veterinary Pathology, Ankara University for diagnosis. In accordance with the aim of the present study, only 18 cases with suspected mixed neoplastic composition were included for evaluation, unlike a previous study (Anadol et al., 2017).

General Physical and Clinical Examinations

General physical examinations were performed routinely for all animals. In each case, all mammary glands and regional lymph nodes were examined and evaluated clinically. In addition, the number of tumours per animal, location, adherence to skin, adherence to underlying tissues, and tumour ulceration were recorded.

Macroscopic and Histopathological Examinations

The tissues were observed and evaluated on the basis of general macroscopic criteria. The tissues were fixed in 10% buffered formalin solution, and were then passed through degraded alcohol and xylol series in autotechnicon (Leica) and embedded in paraffin wax. Sections 5 µm in thickness were cut from the paraffin block and routinely stained with haematoxylin and eosin (H&E). After the histopathological analysis, the neoplastic changes in the mammary glands were evaluated according to the Goldschmidt et al. classification (2011).

Immunohistochemical Analysis

The strept-avidin-biotin complex peroxidase (Strept ABC-P) method was used to show CXCL12 and GPCR30 expressed cells. The sections on positive charged glass slides were deparaffinized and rehydrated by passing through xylene and degraded alcohol series. Antigenic retrieval was performed using citrate buffer EDTA solution (pH=6.0) (Bioptica). The sections were kept for 20 minutes at 750 W. For retrieval of endogenous peroxidase activity, the sections were treated with 3% H₂O₂-methanol solution for 5 minutes at room temperature. Non-specific protein activities in tissue were retrieved using blocking serum (Novocastra, Leica, RE7120-K). Primary antibodies (CXCL12 at 1/200 dilution, ABIN1585802, Antibodiesonline, , GPCR30 at 1/200 dilution, ab188607, Abcam) were dropped onto the sections and incubated at +4°C overnight. Then biotinylated and Horse Radish Peroxidase marked sera were consecutively added and the sections were incubated for 45 minutes at 37°C. As chromogen, Diaminobenzidine (DAB) was added and left for 5 minutes. For counterstaining, Gill's haematoxylin was used. After passing through degraded alcohol and xylol series, the sections were mounted with a non-aqueous medium (Entellan). Until the DAB stage, the sections were washed in TBS with Tween 20 (TBST) for 1 minute twice after the end of each step except the protein blocking step. The findings were evaluated under light microscope (Leica DM4000) and visualised on the digitalized camera attachment.

Scoring of mitotic index and immunohistochemical expressions in canine mammary tissues

The mitotic index was calculated according to the Nottingham grading system in the Elston-Ellis modification of the original Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grading system, which is popularly known as the contemporary European Breast Cancer Grading System (Simpson et al., 2000). In this scoring system, mitotic figures were counted histomorphologically by screening 10 microscopic areas at the periphery of the tumour at

x400 magnification (10 High Power Fields-HPFs). Up to 9 mitoses per 10 fields were scored as 1 point, 10-19 mitoses 2 points, and more than 20 or more mitoses, 3 points. Immunohistochemical expressions were evaluated by counting the expressed cells at x400 magnification in 10 HPFs. The immunoexpressions were scored semiquantitatively as 0-10% (negative), 10-30% (mild positive), 30-70% (moderate positive), and 70-100% (strong positive).

RESULTS

General physical and clinical findings

In the physical examination, no problems were determined apart from the excessive masses in the mammary lobes. In the clinical examination, the unilateral / bilateral masses in the mammary lobes were generally not painful, but some showed painful characteristics due to ulceration and/or necrosis. During palpation of the masses, it was noticed that the affected lobes were warmer to the touch compared to the other mammary lobes. Some were fluctuant in consistency. On the radiographic examinations, there were no cases showing metastatic foci in any location (mainly regional lymph nodes and lungs).

Macroscopic and histopathological findings

Macroscopically, the masses were generally swollen with an elastic and sometimes fluctuant consistency. The dimensions and localizations are shown in Table-1. Cut sections were generally multilobular in appearance. In 5 samples, there was pus or mucoid substance discharge from cystic or cavernous areas in the cut sections. In general, the masses were yellowish-grayish white in color.

Histopathologically, complex-type carcinoma (n=3) included a malignant epithelial component and a benign myoepithelial component. The neoplasm was characterized by irregular tubules, sometimes necrosis and irregular bundles within a myxoid matrix consisting of myoepithelial cells within the interstitium. Mixed-type carcinoma (n=6) included a malignant epithelial component and benign mesenchymal component. The neoplasm was characterized by irregular tubules, myoepithelial cells and foci of cartilage and/or bone. Carcinosarcoma (n=7) included malignant epithelial cells and cells morphologically resembling connective tissue elements. Carcinoma and malignant myoepithelioma (n=2) included malignant epithelial cells and myoepithelial cells. There were varying degrees of mitotic activities in the cases: low mitotic index (10 malignant cases), moderate mitotic index (4 malignant cases) and finally high mitotic index (2 malignant cases). Inflammatory cells were found in 11 cases and no inflammatory cell infiltration into neoplastic areas

was determined in 7 cases. The composition of inflammatory cells was predominantly neutrophils, leukocytes, lymphocytes, plasma cells and macrophages, respectively (Figures 1-3).

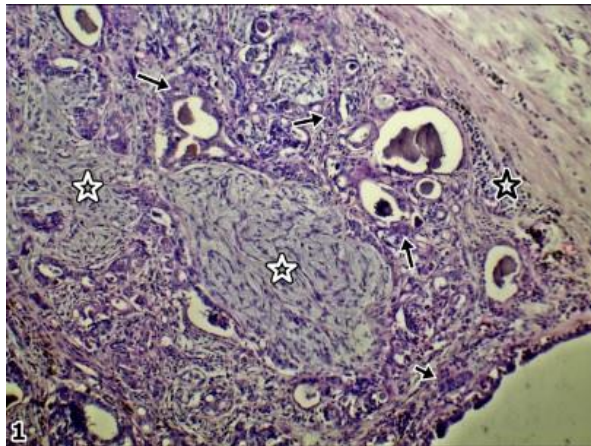


Figure-1. Anaplastic mammary gland cells (arrow), myoepithelial cells (black stars) and inflammatory cell infiltration (white stars), mixed type carcinoma, x100, H&E.

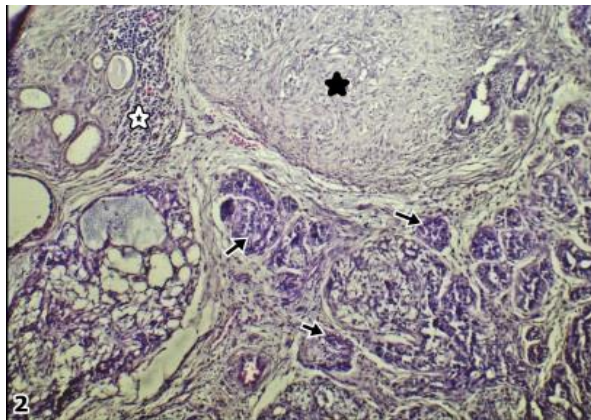


Figure-2. Anaplastic mammary gland cells (arrows), myxoid matrix (white stars) and inflammatory cell infiltration (black stars), complex type carcinoma, x100, H&E.

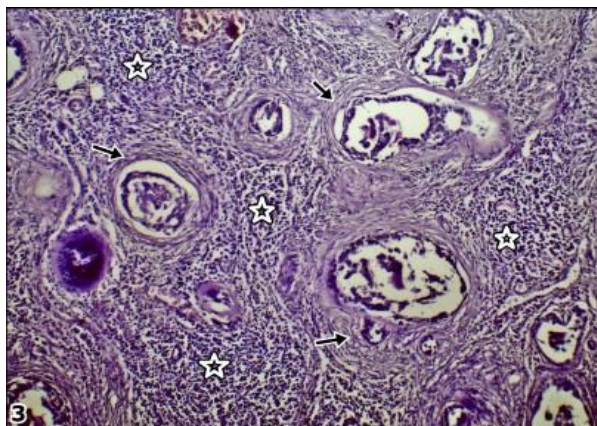


Figure-3. Anaplastic mammary gland cells and peripheral myoepithelial cell proliferation (arrows), inflammatory cell infiltration (white stars), carcinoma and malignant myoepithelioma, x100, H&E.

C-X-C motif chemokine 12 protein (CXCL12) and G Protein Coupled Receptor 30 (GPCR30) expressions

CXCL12
Epithelial cells were found positive mildly (n=7) and moderately (n=11), myoepithelial cells were expressed mildly (n=1) and moderately (n=15) and no reaction was seen in 2 cases. Fibrocytes and fibroblast expression were found at mild and moderate levels in 7 cases for each. The remaining 4 cases were negative. Inflammatory cells were found positive mildly (1 of cases), moderately (n=8) and strongly (n=2) and no expressions were determined in 7 cases (Figures 4-5).

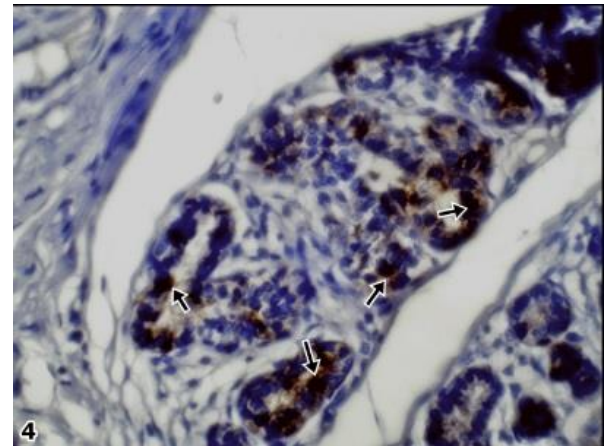


Figure-4. CXCL12 expressions in cytoplasm of anaplastic mammary gland cells (arrows), complex type carcinoma, x400, immunoperoxidase staining.

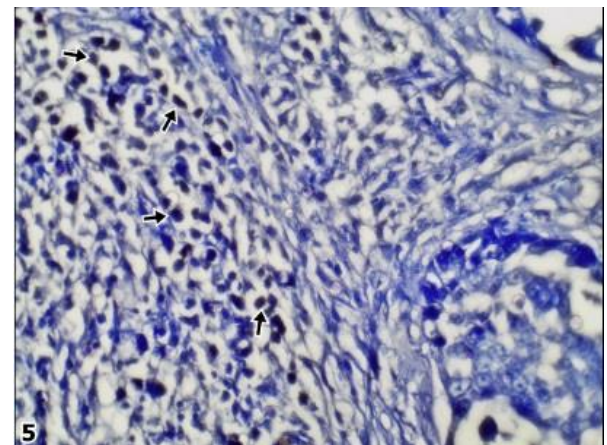


Figure-5. CXCL12 expressions in cytoplasm of mononuclear cells (arrows), complex type carcinoma, x400, immunoperoxidase staining.

GPCR30

Epithelial cells were found positive mildly (n=5), moderately (n=13), myoepithelial cells were expressed mildly (n=2) and moderately (n=16) and there was no reaction in 2 cases. Fibrocytes and fibroblast expression were found mildly (n=9) and moderately (n=3) with no reaction determined in 6 cases. Inflammatory cells were found positive moderately (n=11) and no expression in 7 cases

(Figures 6-8). The scored expressions are shown in Table-1.

DISCUSSION

Previous studies on the etiopathogenesis of canine mammary tumours (CMT) have focussed on factors determining the malignant transformation of benign mixed tumours (Ramalho et al., 2006). In this malignant transformation, certain components of the extracellular matrix of the cellular environment participate in the process of malignant transformation (Cassali et al., 2011).

For many years, there have been different opinions regarding tumours of mixed composition, and they are not yet fully understood (Cassali et al., 2011). Some researchers have stated that mixed tumors originate from mesenchymal tissues including cartilage, bone and stromal connective tissue, while others have stated that the mesenchymal components originate from myoepithelial cells (Hurley et al., 1964; Pulley et al., 1973; Tateyama and Cothcin,1977). In both this study and a previous study by the current authors, evaluation was made of both mammary carcinoma and mixed tumors classified using the Goldschmidt et al. system (2011). According to the results obtained, malignant tumors of mixed composition exhibit malignancy in the epithelial cells compared to the preponderance of the mitotic index. Thus, the current study results showed great parallelism with previous studies.

In this study, a possible interaction was described between neoplastic mammary gland epithelia - mesenchymal cells in their micro-environment and inflammatory cells. In this context, increased expressions were observed of C-X-C motif chemokine 12 protein (CXCL12) and GPCR 30 or G-protein-coupled estrogen receptor-1 (GPER1), which are two members of the inflammatory mediator family, found in mixed composition benign and malignant tumors.

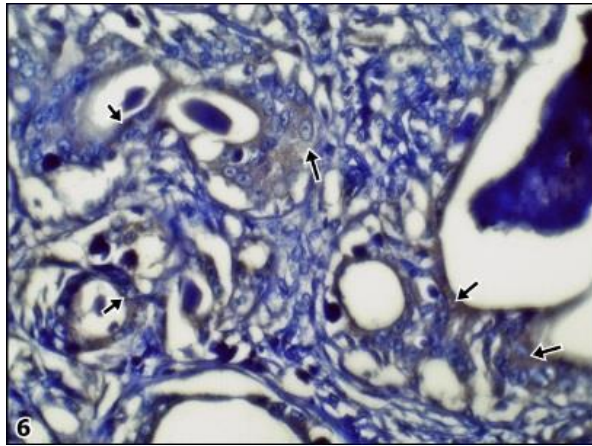


Figure-6. GPCR30 expressions in cytoplasm of anaplastic mammary gland cells (arrows), complex type carcinoma, x400, immunoperoxidase staining.

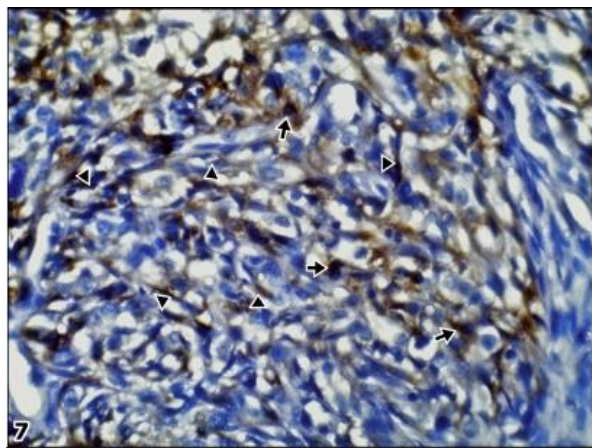


Figure-7. GPCR30 expressions in cytoplasm of malignant mesenchymal and myoepithelial cells (arrows), carcinosarcoma, x400, immunoperoxidase staining.

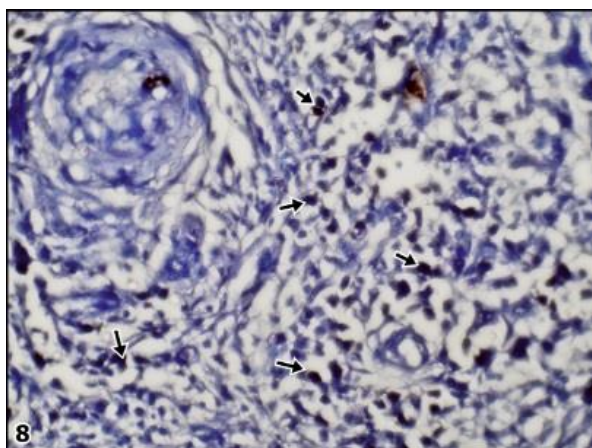


Figure-8. GPCR30 expressions in inflammatory cells (arrows), carcinosarcoma, x400, immunoperoxidase staining.

Table-1. Identities and mass localization in cases with Canine Mammary Tumor, histopathological diagnosis and immunohistochemical expression.

Case Number	Identification Age-breeds	Localization of masses and dimension	Histopathological Diagnosis	Mitotic index	CXCL12 expressions	G30 Protein expressions
1	Terrier 14 years old	Right abdominal cranial 2x2x4 cm	Carcinoma mixed type	1	E + My + Fib ++	E + My ++ Fib +
2	German Shephard dog 13 years old	Right abdominal cranial 1x0.5x1 cm, Left abdominal caudal 2x2x1 cm	Carcinosarcoma Lymphocyte and neutrophil leucocyte infiltration	2	E+ IC++ My+++ Fib+	E+ IC++ My+++ Fib+
3	Terrier 8 years old	Left abdominal cranial 3x2x1.5 cm	Carcinosarcoma Lymphocyte, plasma cell and neutrophil leucocyte infiltration	2	E + IC+++ My- Fib-	E ++ IC++ My+++ Fib-
4	Mixed breed age not known	Left abdominal caudal 3x3x4 cm	Carcinosarcoma Lymphocyte and neutrophil leucocyte infiltration	2	E+ IC++ My+++ Fib-	E++ IC++ My+++ Fib++
5	Terrier 8 years old	Left abdominal caudal 2x2x2 cm	Carcinoma mixed type Lymphocyte infiltration	3	E ++ IC+++ My+++ Fib-	E + IC++ My+ Fib-
6	Boxer 13 years old	Left abdominal cranial 3x2x4 cm	Carcinosarcoma Lymphocyte and neutrophil leucocyte infiltration	2	E++ IC++ My+++ Fib-	E++ IC++ My+++ Fib-
7	Spaniel Cooker 13 years old	Right abdominal cranial 3x4x3 cm	Carcinosarcoma	1	E+ My- Fib-	E+ My+ Fib-
8	Pekingese 14 years old	Left abdominal cranial 1x0.5x2 cm	Carcinoma mixed type	3	E ++ IC++ My+++ Fib+	E ++ IC++ My+++ Fib++
9	Mixed breed 10 years old	Right abdominal cranial 3x2x5 cm, Left abdominal caudal 2x2x3 cm	Carcinoma mixed type	2	E++ My+++ Fib++	E++ My+++ Fib++
10	Kangal 4 years old	Left inguinal 4x5x1.3 cm	Carcinosarcoma Lymphocyte and neutrophil leucocyte infiltration	1	E++ IC++ My+++ Fib+++	E+ IC++ My+++ Fib+++
11	Terrier 12 years old	Right inguinal 2.5x1.7x1.5 cm	Carcinoma complex type Lymphocyte, plasma cell and neutrophil leucocyte infiltration	1	E+ IC++ My+++ Fib+++	E+ IC++ My+++ Fib-
12	Mixed breed Age not known	Left abdominal caudal 3.5x1.8x1.9 cm	Carcinoma mixed type	1	E++ My+++ Fib+	E++ My+++ Fib+
13	Mixed breed 13 years old	Left inguinal 6x3x0.5 cm	Carcinoma complex type Plasma cell infiltration	2	E ++ IC+ My+++ Fib-	E++ IC++ My+++ Fib-
14	Mixed breed 12 years old	Left inguinal 8x6x4 cm	Carcinoma and malignant myoepithelioma	1	E++ My+++ Fib+	E++ My+++ Fib-
15	Mixed breed Age not known	Right abdominal caudal 7x5x3 cm	Carcinoma complex type	1	E++ My+++ Fib-	E+ My+++ Fib-
16	Mixed breed 12 years old	Right thoracic cranial 5x4x4.5 cm	Carcinosarcoma Neutrophil leucocyte infiltration	1	E+ IC++ My+++ Fib+++	E+ My+++ Fib-
17	Mixed breed 6 years old	Left abdominal caudal 5x5.5x3.5 cm	Carcinoma and malignant myoepithelioma Lymphocyte infiltration	1	E++ IC++ My+++ Fib+++	E++ IC++ My+++ Fib+++
18	Mixed breed 8 years old	Right abdominal cranial 4x3.5x3.2 cm	Carcinoma mixed type Lymphocyte and neutrophil leucocyte infiltration	1	E+++ My+++ Fib+++	E+++ IC++ My+++ Fib+++

Mitotic index: 0 mitotic figure (0 point), 1-9 mitotic figures (1 point), 10-19 mitotic figures (2 points), higher than 20 mitotic figures (3 points), E: Glandular and ductal epithelial cells, My: Myoepithelial cells, Fib: Fibrocytes and fibroblasts, IC: Inflammation cells, Scores of cells: + (mild positive), ++ (moderate positive), +++ (strong positive), Mitotik indeks: 0 mitotik figür (0 puan), 1-9 mitotik figür (1 puan), 10-19 mitotik figür (2 puan), 20'den fazla mitotik figür (3 puan), E: Bez ve akatıcı kanal epitel hücreleri, My: myoepitel hücreleri, Fib: Fibrosit ve fibroblastlar, IC: Yangı hücreleri, Hücrelerin skorlanması: + (hafif pozitif), ++ (orta şiddette pozitif), +++ (güçlü pozitif).

An important activator of neoplastic change is CXCL12, which is produced by inflammatory cells in the tumor micro-environment and may recruit other cancer cell types (Luker and Luker, 2006). CXCL12 induced-CXCR4 has been shown to be linked to components of the extracellular matrix (ECM). (Hartman et al., 2005). Therefore, migration of cells and interactions with extracellular matrix molecules such as matrix metalloproteinases (MMP) 2 and 9 make the formation of a mixed tumor much easier after the molecules have overexpressed CXCL12 (Kang et al., 2005). It has been reported that interaction in the cellular micro-environment can increase invasion and motility in the cells and enhance tumor malignancy (Boimel et al., 2012). In the present study, this increased cellular micro-environment activity was observed in several cases in which malignant tumors had mixed composition. It was thought that the CXCL12 produced by numerous inflammatory cells created a signal not only for the mammary gland and duct epithelium, but also for the extracellular matrix in the tumor micro-environment.

CXCR4 and its chemokine ligand CXCL12 are known to be members of the G protein coupled receptors family (GPCRs) (Muller et al., 2001). The GPCRs are the largest family of cell-surface molecules involved in signal transmission. They play a role in tumour growth and metastasis in particular. GPCRs fulfil these roles through expression in proliferating malignant cells. Consequently, they make an important contribution to tissue remodelling, inflammation, angiogenesis, and cancer. In this context, there is a possible relationship between chronic inflammation and cancer similar to CXCL12 produced by inflammatory cells. In the signalling mechanism, G-protein-linked Prostaglandin E2 receptors trigger an alternative stimulation to cyclooxygenase 2 (COX2). In this neoplastic progression, the pro-inflammatory function of COX is initiated (Dorsam and Gutkind, 2007; Feigin et al., 2014). A relationship between increased COX2 levels and high tumor malignancy was also reported in our previous study (Anadol et al., 2017). In that study, it was thought that CXCL12 might have a key role in triggering COX2 and subsequent neoplastic progression in the canine mammary gland after subacute and chronic inflammation.

On the other hand, GPCR30 or G-protein-coupled estrogen receptor-1 (GPER), which is another key factor in the GPCRs family, activates some signals for 17 beta-estradiol (Filardo et al., 2000). In this cascade, after 17beta-estradiol is bound to GPCR30, it causes a dissociation in the heterotrimeric G-protein complex. (Luttrell et al., 1999). Epidermal Growth Factors (EPGF) are

activated and subsequently this situation enhances cellular proliferation (Maggiolini et al., 2004; Girgert et al., 2012). The relationship between GPCR30 and breast cancer have been previously reported (Girgert et al., 2012). In the light of the aforementioned findings, it was thought that GPCRs triggered neoplastic activity in both epithelial and mesenchymal cells through a dual mechanism after affecting prostaglandin and estradiol signals during the inflammation process.

In conclusion, both CXCL12 and GPCR30 can be considered to have a central role within the inflammation process of canine mammary glands. After expression in inflammatory cells, both may trigger a cascade of neoplastic transformation in the epithelium and the extracellular matrix as the micro-environment. As a result of this activation, the condition may result in malignant tumors in dogs. This study can be considered to shed light on the etiopathogenesis of mixed type tumors.

ACKNOWLEDGMENTS

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

REFERENCES

- Anadol, E., Yar Saglam, A.S., Gultiken, N., Karakas, K., Alcigir, E., Alkan, H., Kanca H. Expression of iNOS, COX-2 and VEGF in canine mammary tumours and non-neoplastic mammary glands: Association with clinicopathological features and tumour grade. *Acta Vet Hung.* 2017; 65(3):382-393.
- Boimel PJ, Smirnova T, Zhou ZN, Wyckoff J, Park H, Coniglio SJ, Qian BZ, Stanley ER, Cox D, Pollard JW, Muller WJ, Condeelis J, Segall JE. Contribution of CXCL12 secretion to invasion of breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 2012; 14:R23.
- Boldizsar H, Szenci O, Muray T, Csenki J. Studies on canine mammary tumours. I. Age, seasonal and breed distribution. *Acta Vet Hung.* 1992; 40(1-2): 75-87.
- Cassali GD, Lavallo GE, De Nardi AB. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Brazil J Vet Pathol.* 2011; 4(2): 153–180.
- Crump M, Sawka CA, DeBoer G, Buchanan RB, Ingle JN, Forbes J, Meakin JW, Shelley W, Pritchard KI. An individual patient-based meta-analysis of tamoxifen

- versus ovarian ablation as first line endocrine therapy for premenopausal women with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1997; 44(3):201-10.
- Dewan MZ, Ahmed S, Iwasaki Y, Ohba K, Toi M, Yamamoto N.** Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer. *Biomed Pharmacotherapy* 2006; 60:273–276.
- Dorsam RT, Gutkind JS.** G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2007; 7: 79–94.
- Egenvall A, Bonnett BN, Ohagen P, Olson P, Hedhammar A, von Euler H.** Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Prev Vet Med.* 2005; 69(1-2): 109-127.
- Feigin ME, Xue B, Hammell MC, Muthuswamy SK.** G-protein-coupled receptor GPR161 is overexpressed in breast cancer and is a promoter of cell proliferation and invasion. *PNAS.* 2014; 111 (11): 4191–4196.
- Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR Jr.** Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol.* 2000; 14(10):1649-1660.
- Girgert R, Emons G, Gründker C.** Inactivation of GPR30 reduces growth of triple-negative breast cancer cells: possible application in targeted therapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; 134(1):199-205.
- Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zappulli V.** Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol.* 2011; 48(1):117-1131.
- Hartmann T, Burger J, Glodek A, Fujii N, Burger M.** CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells. *Oncogene.* 2005; 23;24(27):4462-71.
- Hurley JV, Jabara AG.** 1964. Properties of “cartilage” in canine mammary tumors. *Arch Pathol.* 77:343–347.
- Kang H, Mansel R, Jiang W.** Genetic manipulation of stromal cell-derived factor-1 attests the pivotal role of the autocrine SDF-1-CXCR4 pathway in the aggressiveness of breast cancer cells. *Int J Oncol.* 2005; 26: 1429–1434.
- Li S, Huang S, Peng SB.** Overexpression of G protein-coupled receptors in cancer cells: Involvement in tumor progression. *Int J Oncol.* 2005; 27, 1329–1339.
- Luker K.E., Luker G.D.** Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. *Cancer Lett.* 2006; 238: 30–41.
- Luttrell LM, Daaka Y, Lefkowitz RJ.** Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11:177–183.
- Maggiolini M, Vivacqua A, Fasanella G, Recchia AG, Sisci D, Pezzi V, Montanaro D, Musti AM, Picard D, Ando S.** The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2004; 279:27008–27016.
- Misdorp W.** Veterinary cancer epidemiology. *Vet Quart.* 1996; 18: 32- 36.
- Misdorp W, Else RW, Hellmen E.** Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat, World Health Organization, Geneva, Switzerland. 1999.
- Moe L.** Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. *J Reprod Fertil Suppl.* 2001; 57: 439-443.
- Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME.** Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature.* 2001; 410(6824):50–6.
- Perez-Alenza MD, Pena L, Del Castillo N, Nieto A.** Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumors. *J Small Anim Pract* 2000; 41: 287-291.
- Priester WA.** Occurrence of mammary neoplasms in bitches in relation to breed, age, tumour type, and geographical region from which reported. *J Small Anim Pract.* 1979; 20(1): 1-11.
- Pulley, LT.** Ultrastructural and histochemical demonstration of myoepithelium in mixed tumors of the canine mammary gland. *Am J Vet Res.* 1973; 34(12): 1513–1522.
- Ramalho LNZ, Ribeiro-Silva A, Cassali GD, Zucoloto S.** The expression of p63 and cytokeratin 5 in mixed tumors of the canine mammary gland provides new insights into the histogenesis of these neoplasms. *Vet Pathol.* 2006; 43(4):424–429.

- Salvucci O, Yao L, Villalba S, Sajewicz A, Pittaluga S, Tosato G.** Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor-1. *Blood*. 2002; 99:2703–2711.
- Simpson JF, Gray R, Dressler LG, Cobau CD, Falkson CI, Gilchrist KW, Pandya KJ, Page DL, Robert NJ.** Prognostic value of histologic grade and proliferative activity in axillary node-positive breast cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Companion Study, EST 4189. *J Clin Oncol*. 2000; 18: 2059–2069.
- Spiegelberg BD, Hamm HE.** 2007. Roles of G-protein-coupled receptor signaling in cancer biology and gene transcription. *Curr Opin Genet Dev*. 2007; 17: 40–44.
- Tateyama S, Cotchin E.** Alkaline phosphatase reaction of canine mammary mixed tumours: a light and electron microscopic study. *Res Vet Sci*. 1977; 23(3), 356–364.
- Zlotnik A, Yoshie O.** Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000; 12:121–127.

Presence of Beta-Lactam Antibiotic Residues in Raw Milk Obtained From Afyonkarahisar Province[#]

Eda AYCAN¹, Sinan INCE^{2*}

¹Department of Animal Health, Food, Agriculture, and Animal Husbandry Provincial Directorate, Elbistan, Kahramanmaraş, Turkey

²Department of Pharmacology and Toxicology, University of Afyon Kocatepe, Afyonkarahisar, Turkey

[#]This study was supported by a grant from the Afyon Kocatepe University Scientific Research Council, Afyonkarahisar, Turkey (Project Code: 15.SAG.BIL.26) and it was summarized from same named master thesis. Also, this study was presented at International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences Congress, Ankara, Turkey.

*Corresponding author e-mail: since@aku.edu.tr

ABSTRACT

Antibiotics usage for treating, protective, and similar purposes of animals may cause residue in foods of animal origin. Raw milk has high risk in terms of antibiotics residue. The consumption of such foods can cause serious health problems in human. For this purpose, 80 raw milk samples were collected from Afyonkarahisar province and analysed for beta-lactam antibiotics by means of ELISA. The result of analyses showed that 38 samples did not contain beta-lactam residue, 35 samples contained different concentration and acceptable maximum residue limits of beta-lactam, and 7 samples contained residues above 3 ppb but below 30 ppb. In conclusion, relatively high level of residue in raw milk showed that milk is offered for human consumption without taking it into consideration of withdrawal time.

Key words: Antibiotic, beta-lactam, residue, milk

Afyonkarahisar Bölgesinden Toplanan Çiğ Sütlerde Beta-Laktam Grubu Antibiyotik Kalıntı Varlığının Araştırılması

ÖZ

Hayvanlarda tedavi edici, koruyucu ve benzeri amaçlarla kullanılan antibiyotikler bu hayvanlardan elde edilen gıdalarda kalıntı bırakabilmektedir. Antibiyotik kalıntıları bakımından çiğ süt yüksek risk içermektedir. Böyle gıdaların insanlar tarafından tüketimi ise ciddi sağlık sorunlarına neden olabilmektedir. Bu amaçla, Afyonkarahisar bölgesinden toplanan 80 çiğ süt örneği beta-laktam antibiyotik kalıntı varlığı bakımından ELISA yöntemiyle analiz edildi. Yapılan analizler neticesinde 38 örneğin beta-laktam grubu antibiyotik kalıntısı içermediği, 35 örneğin değişen konsantrasyonlarda ve bulunmasına izin verilen maksimum kalıntı limitleri içerisinde ve 7 numunenin ise 3 ppb'nin üzerinde fakat 30 ppb'nin altında beta-laktam antibiyotik kalıntısı içerdiği tespit edildi. Sonuç olarak, çiğ sütlerde saptanan değerlerin nispeten yüksek olmasının antibiyotik verilmiş hayvanlardan gerekli arınma süresi geçmeden sütlerin tüketime verildiği şeklinde değerlendirildi.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik, beta-laktam, kalıntı, süt

To cite this article: Aycan E. Ince S. Presence Of Beta-Lactam Antibiotic Residues In Raw Milk Obtained From Afyonkarahisar Province *Kocatepe Vet J. (2018) 11(2): 113-118.*

INTRODUCTION

Milk plays a significant role in children and infants nutrition. However, intensive and inappropriate use of antibiotics for the treatment of milk producing animals can result in the high prevalence of antibiotic residues in milk which can cause antibiotic resistance in several pathogenic bacteria. Antibiotic residues in milk could cause undesirable effects on human health (Kaya and Filazi 2010; Zhu et al. 2013; Acaroz et al. 2015).

Some studies showed that milk and its products could be contaminated with veterinary drugs, toxins, and other chemical agents (Kaya and Filazi, 2010; Filazi et al. 2010; Kara and Ince, 2014; 2016; Yu et al., 2017). Cristina et al. (2010) performed a study in 90 cow milk and 65 beef samples regarding macrolide antibiotic residues, in Spain. According to this study, tilmicosin, tylosin, spiramycin, and lincomycin residues were found in 44 of 90 milk samples. Han et al. (2013) collected 180 ultra-high temperature processing (UHT) milk samples from 25 different cities and markets of China. Milk samples were examined regarding antibiotic residue and sulfamethazine, sulfonamide, and quinolone antibiotic levels were found to be high level except for tetracyclines. In another study, 100 raw, 50 pasteurised, and 50 UHT (totally, 200 milk samples) milk sold in Ankara market evaluated regarding antibiotic residue and 5.5 % of milk samples were penicillin positive (Ceyhan and Bozkurt, 1987). Also, 50 raw milk samples collected from various dairy and dairy plants in

Konya. These milk samples were evaluated regarding penicillin G, ampicillin, and penicillin V residues by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and six milk samples were found to have antibiotic residues (Demet et al., 1992).

In this study, it was aimed to monitor the presence of antibiotic residues in milk. For this purpose, beta-lactam group antibiotic residues were investigated using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method in 80 raw milk samples collected from Afyonkarahisar.

MATERIAL and METHOD

In this study, beta-lactam-derived antibiotic residues were investigated in raw milk in Afyonkarahisar, Turkey. For that purpose, 80 milk samples were collected after milking from the various dairy plants between August-October in 2015 (Table 1). The milk samples were taken into the sterile plastic tubes, immediately brought to the laboratory and were kept at -20 °C until analysis.

5 ml of milk samples were put into each tube and centrifuged at 2000 rpm for 15 minutes. After centrifugation, the upper creamy layer was completely removed. The defatted supernatant obtained and was used for the analysis. Randox beta-lactam ELISA kit was used for the analysis. The compounds of the beta-lactam ELISA kit and the cross-reactivity were given in Table 2.

Table 1. Districts and centers where milk samples were collected

Tablo 1. Süt numunelerinin alındığı ilçe ve merkezler

Districts	Centers
City Center	Çayırbağ, Çakırık, Gebeceler, Fethibey, Erkmen, Susuz, Çukurköy, Saraydüzü, Karşıyaka, Sahipata, Nuribey, Sülün, Değirmendere, Sülümenli, Büyükkalecik Beyyazı,
Sinanpaşa	Akören, Çobanozu, Garipçe, Saraycık, Tınaztepe
Çay	Çayırpınar, Karacaören, Deresine, Bahçelievler, Göcen
İhsaniye	Gazlıgöl, Karacaahmet, Ayazini, Cumalı, Döğer, Orhanlı
Şuhut	Koçyatağı, Senir, Taşlıca, İsalı
Evciler	Altınova, Kayalık

Table 2. Beta-lactam ELISA kit compounds and their cross reactivity

Tablo 2. Beta-laktam ELISA kitinin bileşikleri ve çapraz reaktivitesi

Compound	Cross Reactivity (%)
Nafcillin	144
Ampicillin	100
Amoxicillin	94
Piperasilin	92
Azlocillin	89
Cloxacillin	69
Penicillin G	56
Dicloxacillin	52
Oxacillin	51
Metampicillin	30
Pencillin V	22
Carbenicillin	8
Tricarcillin	6
Cephalosporins	<0.01

RESULTS

At the end of the analysis, standard absorbance values were read and the concentration-absorbance curve shown in Figure 1. Absorbance values of samples were evaluated according to the standard curve. The beta-lactam residue concentration ranges and positive results of 80 milk samples were given in Table 3.

It was found that 38 samples contained no residues, 35 samples were within the maximum residue limits, and 7 samples contained residues above 3 ppb but below 30 ppb. Antibiotic contamination rate was determined as 8.75 % according to the total number of samples.

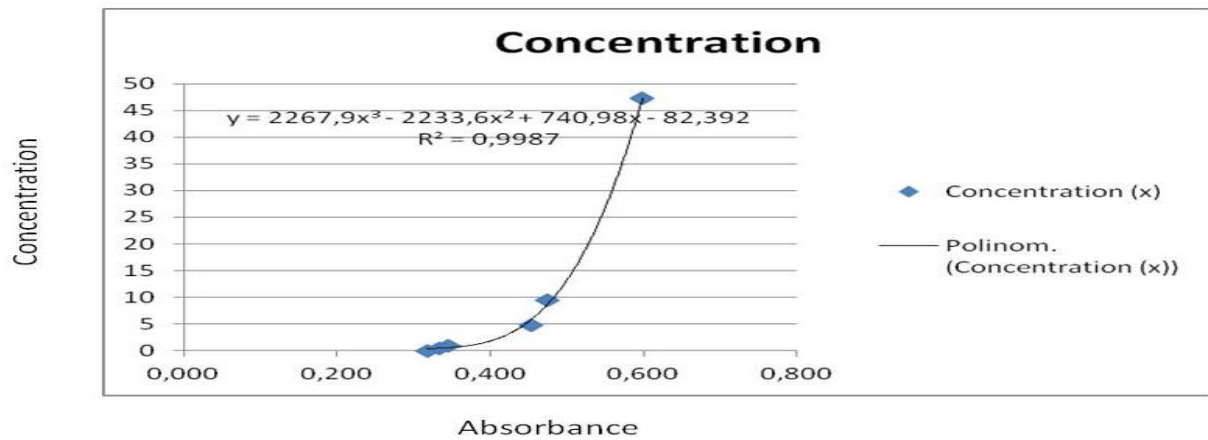


Figure 1. Concentration- Absorbance Standard Curve

Şekil 1. Konsantrasyon- absorbans standart eğrisi

Table 3. Beta-lactam antibiotic residue levels in milk samples
Tablo 3. Süt numunelerindeki beta-laktam antibiyotik kalıntı düzeyleri

Concentration (ppb)	Number of positive samples (n: 80)
0	38
0.1 - 0.5	19
0.5 - 1	8
1 - 3	8
3 - ≤30	7

DISCUSSION

Antimicrobial drugs are employed for the protection and/or treatment of animals against diseases. In addition to the desired effects of drugs and other substances, it should not be overlooked that they may also pose a risk, especially in terms of public health. The most significant of these risks is the residues of these substances. In particular, this situation is vital important for the drugs which have carcinogenic, teratogenic or mutagenic properties. At the same time, those who consume residue-containing products could have a drug allergy and inhibition of the digestive tract bacterial community. Drug residues in animal products have adverse effects regarding consumer health such as allergies and cancer. To analyse the residues of animal products has become increasingly important (Kaya and Unsal, 2000).

In the present study, beta-lactam antibiotic residues were investigated in raw milk samples consumed in Afyonkarahisar by ELISA method. As a consequence of the analysis, no residue was found in 38 samples from the 80 milk samples, in 35 samples beta-lactam antibiotic residues were detected in varying concentrations within the maximum permissible residue limits. In addition to this, beta-lactam antibiotic residues in 7 milk samples were detected among to 3 and 30 ppb.

In a survey, beta-lactam residues were investigated qualitatively in the milk samples consumed in Şanlıurfa, 64 of 300 milk samples were found to contain beta-lactam antibiotic residues, and 32 samples had other antimicrobial activity residues (Ardıç and Durmaz, 2006).

Temamoğulları and Kaya (2010) conducted a residue analysis regarding ampicillin, amoxicillin, danofloxacin, enrofloxacin, erythromycin, florfenicol, and cloxacillin in 120 pasteurise and

120 raw milk samples from 7 commercial companies. For the residue analysis, thin layer chromatography and microbiological disc diffusion technique based on bioautography were used. According to the results, ampicillin residue was detected in 1 pasteurised milk sample and it was not detected any antibiotic residue in 239 samples.

Kaya and Filazi (2010) analysed penicillin G, oxytetracycline, gentamycin, streptomycin, and neomycin antibiotic residues totally 240 raw milk samples and pasteurised milk products sold in Ankara. 1 sample of the pasteurised milk samples had 150.4 µg/L oxytetracycline, 1 sample of the pasteurised milk samples had 33.5 µg/L penicillin G and 1 of the raw milk sample showed 768.4 µg/L neomycin and these concentrations of the residues in milk were above the maximum permissible residue limits in Turkey and European Union countries.

Torlak et al. (2012) performed a study to determine the performance of 3 different antibiotic test kits based on various principles was evaluated in artificially contaminated raw milk samples regarding beta-lactam antibiotics such as penicillin G, ampicillin, amoxicillin, and cloxacillin. Detection limits of HPLC method were detected as 8 µg/kg for ampicillin, 8 µg/kg for amoxicillin, 6 µg/kg for penicillin G, and 11 µg/kg for cloxacillin. In this study, the detection limits obtained by the chromatographic method were found to be above the maximum residue limits of Turkey and the European Union regarding ampicillin, amoxicillin, and penicillin G. In addition, 75 raw milk and 14 pasteurised milk of 89 milk samples, from 7 commercial firms and 9 different milking units, were evaluated in terms of chloramphenicol residues by thin layer chromatography/bioautographic method and chloramphenicol residues detected in 6 milk samples (0.8-1.6 ppm) (Şanlı et al., 1991).

In a study performed with 150 raw milk samples, collected in and around Bursa, were evaluated regarding chloramphenicol residues and it was detected in 2 milk samples (Dokuzlu and Tayyar, 2000). Similarly, in 61 milk samples collected from a various dairy plant in Konya evaluated regarding chloramphenicol residue and it was detected in 28 milk samples by HPLC (Demet et al., 1992).

Önal et al. (1993) performed a study to detect chloramphenicol residue by using intertest and triple plaque test in 444 raw and pasteurised milk obtained from public and private sector enterprises in Ankara, 78 positive (17.56 %), 65 suspected (14.63 %), 301 negative (67.79 %) results were found by intertest method and 24 positive (5.40 %), 1 suspected (0.22 %) and 419 negative (94.36 %) results were found by triple plaque method performed with *B. subtilis*.

According to the "Regulations of Pharmacological Active Ingredients and Maximum Residue Limits Regulation in Animal Husbandry" in the Turkish Food Codex, maximum residue limits of beta-lactam for penicillin derivative drugs in milk such as ampicillin, amoxicillin, and benzylpenicillin are determined as 3 ppb, for cloxacillin, dicloxacillin, nafcillin, and oxacillin as 30 ppb. Maximum residue limit for cephalosporins in milk is determined as 50 ppb (TGGK, 2007). Obtained data from our study showed that 7 samples were above 3 ppb and it was determined that beta-lactam antibiotics residue in the milk might have potential risk. This can be interpreted as the consumed milk is obtained from antibiotic given animals without waiting the withdrawal period of antibiotics.

As a result, breeders should pay attention to withdrawal period of antibiotics, they should be educated and samples from animal need to be taken and regularly controlled regarding human and living organisms health.

REFERENCES

- Acaroz U, Arslan-Acaroz D, Gürler Z.** Gıdalarda antibiyotik kalıntılarının saptanması için enzim immunoassay geliştirilmesi. *Kocatepe Veteriner Dergisi.* 2016; 9(2): 122-126
- Ardıç M, Durmaz H.** Investigation of beta-lactam residues in unpacked milk consumed in Sanlıurfa. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimler Dergisi.* 2006; 1: 74-77.
- Ceyhan I, Bozkurt M.** Ankara piyasasında satılan sütlerde penisilin araştırması. *Türk Hijyen Derneği Biyoloji Dergisi.* 1986; 44: 1-5.
- Cristina J, Juan CM, Jord M, Guillermina F.** Determination of macrolide and lincosamide antibiotics by pressurised liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry in meat and milk. *Food Control.* 2010; 21: 1703-1709.
- Demet Ö, Acet A, Traş B, Baş L, Eğilmez İ.** Konya'da tüketime sunulan yumurtalarda kloramfenikol furazolidon ilaç kalıntılarının araştırılması. *Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.* 1992; 6: 61-63.
- Dokuzlu C, Tayyar M.** Bursa ve çevresinde çiğ sütlerde antibiyotik varlığının belirlenmesi. *Veteriner Bilimleri Dergisi.* 2001; 17: 153-157.
- Filazi A, Ince S, Temamogullari F.** Survey of the occurrence of aflatoxin M1 in cheeses produced by dairy ewe's milk in Urfa city, Turkey. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.* 2010; 57: 197-199.
- Han W, Zheng N, Wang J, Zheng P, Li Song L, Yu Qun L.** Survey of tetracyclines, sulfonamides, sulfomethazine, and quinolones in uht milk in China market. *Journal of Integrative Agriculture.* 2013; 12: 1300-1305.
- Kara R, Ince S.** Aflatoxin M1 in buffalo and cow milk in Afyonkarahisar, Turkey. *Food Additives & Contaminants: Part B.* 2014; 7(1): 7-10.
- Kara R, Ince S.** Evaluation of malathion and malaonoxon contamination in buffalo and cow milk from Afyonkarahisar Region, Turkey, using liquid chromatography/tandem mass spectrometry—a short report. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences.* 2016; 66(1): 57-60.
- Kaya SE, Filazi A.** Determination of antibiotic residues in milk samples. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.* 2010; 16(Suppl-A), S31-S35.
- Kaya S, Ünsal A.** Besinlerdeki ilaç kalıntıları: In: *Veteriner Uygulamalı Farmakoloji.* Ed; Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A, 2th Ed., Medisan yayınevi, Ankara, Turkey. 2000; pp. 713-743.
- Önal A, Aydın N, Ayaz Y, İşcan D, Savaş N.** Süt ve etlerde bulunan bazı antibiyotiklerin çeşitli yöntemlerle saptanması. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Enstitüsü Dergisi.* 1993; 7: 48-51.
- Şanlı Y, Kaya S, Yavuz H, Aydın N, Akar F, Doğan A.** Süt örneklerinde kloramfenikol kalıntıları. *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi.* 1991; 38: 402-416.

- Temamoğulları F, Kaya S.** Ankara piyasasında satılan sütlerde bazı antibiyotik kalıntılarının ince tabaka kromatografisi ve biyootografik yöntemle saptanması. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2010; 16: 187-191.
- TGK.** Türk Gıda Kodeksi. Hayvansal kökenli gıdalarda veteriner ilaçları maksimum kalıntı limitleri tebliğinde değışiklik yapılması hakkında tebliğ. Resmi Gazete Tebliğ No: 26457, 2007.
- Torlak E, Gökmen M, Gürbüz Ü, Kıztanır B, Işık MK.** Çiğ sütlerde antibiyotik kalıntı analizlerinde hızlı test metotlarının ve HPLC tekniğinin değerlendirilmesi. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimler Dergisi. 2012; 7: 105-111.
- Yu W, Knauer M, Kunas C, Acaroz U, Dietrich R, Märtlbauer E.** A gold nanoparticles growth-based immunoassay for detection of antibiotic residues. Analytical Methods. 2017; 9(2), 188-191.
- Zhu K, Acaröz U, Märtlbauer E.** A cellular logic circuit for the detection of bacterial pore-forming toxins. Chemical Communications. 2013; 49(45): 5198-5200.

Niğde İlindeki Çiğ Koyun, Keçi ve İnek Sütlerinde Aflatoksin M₁ Düzeyleri

Fulden KARADAL^{1*}, Nurhan ERTAS ONMAZ², Harun HIZLISOY³, Yeliz YILDIRIM², Serhat AL², Zafer GONULALAN²

¹ Department of Food Processing, Bor Vocational School, Niğde Omer Halisdemir University, Niğde, Turkey

² Department of Food Hygiene and Technology, Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University, Kayseri, Turkey

³ Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University, Kayseri, Turkey

*Corresponding author e-mail: fkaradal@ohu.edu.tr

ÖZ

Bu çalışmada, Niğde ilinde tüketime sunulan çiğ inek, koyun ve keçi sütlerinde aflatoksin M₁ (AFM₁) varlığının araştırılması, yasal düzenlemeler dikkate alınarak halk sağlığı yönünden tehlike oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi ve sütlerdeki toksin içeriklerinin karşılaştırılması amaçlandı. Çalışmada, 90 çiğ süt örneği toplanarak ELISA tekniği ile analiz edildi. İncelenen tüm süt örneklerinin AFM₁ ile kontamine olduğu koyun ve keçi sütlerindeki AFM₁ düzeyinin yasal limitlerin altında, çiğ inek sütü örneklerinin 3'ünde (%10) ise bu limitlerin üzerinde (50 ng/L) olduğu belirlendi. Ayrıca farklı hayvan türlerinin sütlerindeki AFM₁ düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlemlendi (p < 0.05). Sonuç olarak, Niğde'de koyun ve keçi sütü tüketimi ile AFM₁'e maruz kalma potansiyelinin inek sütü tüketimine oranla daha düşük olduğu belirlendi. Bununla birlikte inek sütlerinde yasal limitlerin üzerinde tespit edilen AFM₁ varlığının halk sağlığı bakımından önemli olduğu ve bu nedenle sütlerin sistematik olarak kontrol edilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin M₁, koyun sütü, keçi sütü, inek sütü, halk sağlığı.

Aflatoxin M₁ Levels In Raw Sheep, Goat And Cow Milks In Niğde Province

ABSTRACT

This study aimed to investigate the presence of aflatoxin M₁ (AFM₁) in raw cow, sheep and goat milk consumed in Niğde and to evaluate whether they pose a risk for public health regarding legal limits and to compare the AFM₁ levels in milk of different species. In the study, 90 raw milk samples were collected and analysed by ELISA technique. All of the milk samples were found to be contaminated with AFM₁. On the other hand AFM₁ contents of all sheep and goat milk samples were below the legal limits, while 3 of the raw cow milk samples (10%) exceeded the limits of concern (50 ng/L). In addition, statistically significant differences were observed between AFM₁ levels in milk of different species (p < 0.05). In conclusion, AFM₁ exposure risk in case of sheep and goat milk consumption is found to be lower than cow milk consumption in Niğde. However, presence of AFM₁ in cow milk samples should be considered as a public health jeopardy, therefore milks should be systematically monitored.

Keywords: Aflatoxin M₁, cow milk, goat milk, sheep milk, public health.

To cite this article: Karadal F, Onmaz Ertas N, Hizlısoy H, Yıldırım Y, Al S, Gonulalan Z. Niğde İlindeki Çiğ Koyun, Keçi ve İnek Sütlerinde Aflatoksin M₁ Düzeyleri *Kocatepe Vet J*. (2018) 11(2):119-125.

GİRİŞ

Süt içerdiği protein, lipit, makro ve mikro elementler gibi temel besin maddeleri nedeniyle, özellikle gelişme çağındaki bireylerin yeterli ve dengeli beslenmesinde büyük önem taşımaktadır. Bununla birlikte, süt ve süt ürünlerinde bulunabilen aflatoksin M₁ (AFM₁), bu tür ürünleri yüksek miktarda tüketen bireylerde sağlıkla ilgili olumsuz etkilere neden olabilmektedir. *Aspergillus* cinsindeki mikotoksijenik funguslar tarafından üretilen aflatoksinler, farklı gıda ve yem maddelerinde en çok araştırılan bulaşanlar grubudur (Creppy, 2002; Duarte ve ark. 2013). Yaklaşık 18 aflatoksin tespit edilmiştir. Bunların arasında Aflatoksin B₁ (AFB₁), DNA hasarına, gen mutasyonuna, kromozom anomalilerine ve hücre transformasyonuna neden olan ve I. sınıf insan kanserojeni olarak tanımlanan, toksik, mutajen ve teratojen bir bileşiktir (Anonim, 2017a). Karsinojenik gücü AFB₁'den 10 kat daha düşük olan ve AFB₁'in süt veren hayvanların karaciğerinde monohidroksile edilmiş türevi olan Aflatoksin M₁ (AFM₁), Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC - International Agency for Research on Cancer) tarafından 2B sınıfı kanserojen madde olarak kategorize edilmiştir (Anonim, 2017a).

AFM₁ hayvanın vücudundan süt, idrar ve dışkı ile atılmaktadır. Sütteki AFM₁ düzeyi, süt veren hayvanların yemlerle aldığı AFB₁ oranına bağlı olarak değişmektedir. AFM₁, kontamine olmuş yemlerin tüketilmesinden 2-3 gün sonra sütte ortaya çıkmakta ve sonraki 2-3 gün boyunca süt ile birlikte atılımı devam etmektedir (Murphy ve ark. 2006; Prandini ve ark., 2009; Sidhu ve ark. 2009). Toksinin pastörizasyon ve UHT (Ultra High Temperature) sterilizasyon gibi ısı işlemlerde inaktive olmaması nedeniyle AFM₁ sadece sülterde değil, aynı zamanda yoğurt, peynir, tereyağı, krema, dondurma ve sütlü tatlılar gibi süt ürünlerinde de bulunabilmektedir (Ertaş ve ark. 2011; Hassan ve Kassafy 2014).

Genotoksik, teratojenik ve insanlar için immünosüpresif olduğu bildirilen AFM₁, üretim proseslerinde veya ısı işlemlerinde yok olmadığından, bu metabolitin Avrupa Birliği (AB) tarafından belirlenen maksimum kalıntı seviyelerine göre, çiğ süt ve süt ürünlerinin en etkin kontrolünü sağlamak büyük önem taşımaktadır. (Creppy, 2002). AFM₁, Codex Alimentarius, EU (European Union) ve Türk Gıda Kodeksi'nde (TGK) sülterdeki maksimum AFM₁ kalıntı oranı 50 ng/L olarak belirlenmiştir (Anonim, 2006; Anonim, 2011; Codex, 2015).

Bu çalışmada, Niğde yöresinde tüketime sunulan inek, koyun ve keçi sülterindeki AFM₁ miktarı ve bu sülterin tüketilmesinin oluşturduğu risklerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Numuneler

Bu çalışmada, Niğde ilindeki süt işletmelerinden, Haziran - Ağustos 2017 tarihleri arasında süt toplama merkezlerinden alınan 90 adet çiğ süt örneği (30 inek, 30 koyun, 30 keçi sütü) materyal olarak kullanıldı. Steril numune kaplarına 200'er mL olarak alınan süt örnekleri soğuk zincir altında laboratuvara getirilerek analiz edildi.

Yöntem

Çalışmada toplanan süt örneklerinde AFM₁ seviyesi ELISA yöntemi ve ticari kit (Helica, Catalog No: 961AFLM01M-96, USA) ile belirlendi.

Süt Numunelerinden AFM₁ Ekstraksiyonu

AFM₁ ekstraksiyonu için oda ısısına getirilen süt örnekleri 2mL'lik eppendorf tüplerine aktarıldı ve 2000 g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj süresi sonunda tüpün üst katmanında oluşan krema tabakası atıldı ve tüpün altında kalan kısımdan 100 µL alınarak ELISA testinde kullanıldı.

ELISA Testi

Standartlar ve örnekler için yeterli sayıda mikrotiter kuyucuk pleyte yerleştirildi. Standart solüsyonlarından ve hazırlanmış örneklerden 200'er µL alınarak kuyucuklara ilave edildi ve oda ısısında karanlık ortamda 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda mikrotiter kuyucuklar, %0,05'lik Tween 20 içeren PBS (Phosphate Buffered Saline) ile ELISA otomatik strip yıkayıcıda (ELX 50, Bio-Tek Instruments, ABD) 3 kez yıkandı. Her bir kuyucuğa 100'er µL enzim konjugat ilave edilerek oda ısısında karanlık ortamda 15 dakika tekrar inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda mikrotiter kuyucuklar ELISA otomatik strip yıkayıcıda 3 kez tekrar yıkandıktan sonra her bir kuyucuğa 100 µL substrat ilave edildi ve iyice karıştırılarak oda ısısında ve karanlık ortamda 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her bir kuyucuğa 100 µL stop solüsyonu koyularak kuyucuklardaki reaksiyonun durması sağlandı. Pleyt, elle hafif şiddette vurmak suretiyle iyice karıştırıldı. ELISA otomatik okuyucuda (Thermo, Finland) 450 nm dalga boyunda okutuldu ve absorbanlar kaydedildi.

Sonuçların Değerlendirilmesi

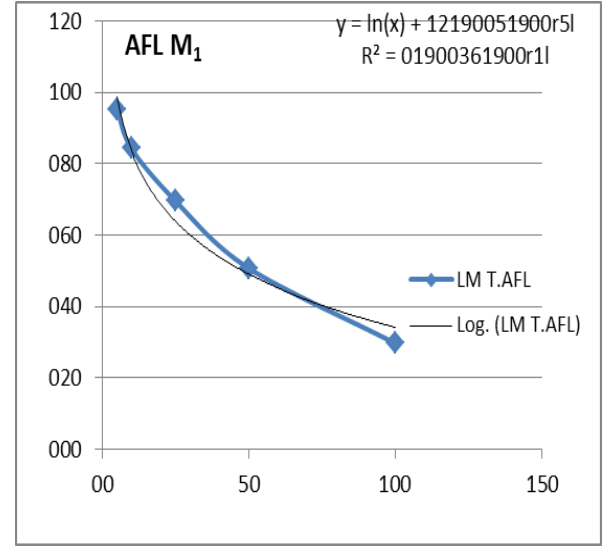
ELISA testi sonuçlarının değerlendirilmesinde; standartlar ve örnekler için bulunan absorbans değerlerinin ortalama değerleri, birinci standartın (0 ppt standardı) absorbans değerine bölündü ve 100 ile çarpıldı. Böylece 0 standardı % 100'e eşit hale getirildi ve absorbans değerleri yüzde olarak bulundu. Standartlar için hesaplanan değerler, semilogaritmik grafik kağıdı üzerine ng/L (ppt) cinsinden AFM₁ konsantrasyonuna karşı koordinatlar sistemine girildi. Her örneğin AFM₁ konsantrasyonu eğri üzerinden ng/L cinsinden okundu.

İstatistiksel Yöntem

Çalışmada, incelenen 3 gruba ait (Grup 1: Çiğ inek sütü, Grup 2: Çiğ koyun sütü, Grup 3: Çiğ keçi sütü) örnekler arasında AFM₁ varlığı açısından istatistiksel bir farklılık olup olmadığı tek yönlü varyans analizi (One Way Anova) ile test edildi. Tek yönlü varyansa analizi sonucunda gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey testi kullanılmıştır. Çalışmada uygulanan istatistiksel yöntemler SPSS 20.0 paket programı yardımıyla yapıldı.

BULGULAR

Çalışma kapsamında, analiz edilen toplam 90 süt örneğinin tamamında 0,33 ng/L- 88,77ng/L aralığında AFM₁ tespit edildi. Analiz edilen süt örneklerinde AFM₁ düzeylerinin belirlenmesi amacı ile kullanılan standartların absorbans değerleri Tablo 1'de ve kalibrasyon eğrisi ise Şekil 1'de gösterildi.



Şekil 1. AFM₁ analiz kalibrasyon eğrisi
Figure 1. AFM₁ analysis calibration curve

Tablo 1. AFM₁ analizinde kullanılan standartların absorbans değerlerine göre elde edilen referans aralıkları
Table 1. Reference ranges obtained from the absorbance values of standards used in AFM₁ analysis

Standart	Konsantrasyonları (ng/L)	Ortalama Absorbans ± % Standart Hata (Sx)
1	0	1.1625±0.009
2	5	1.1076±0.008
3	10	0.98±0.009
4	25	0.8093±1.00
5	50	0.5898±0.009
6	100	0.3453±0.006

Çalışmada incelenen inek, koyun ve keçi, sütlerinin sırasıyla 1,84 -88,77 ng/L, 1,82-7,83 ng/L ve 0,33-11,79 ng/L aralıklarında AFM₁ içerdiği belirlendi. Analiz edilen inek, koyun ve keçi sütü örneklerine ait AFM₁ dağılımları Tablo 2'de özetlendi.

Çalışma süresince analiz edilen çiğ inek sütü örneklerinin 3'ünde (%10) Türk Gıda Kodeksinin süt ürünleri için belirlemiş olduğu maksimum limit olan 50 ng/L'in üzerinde AFM₁ tespit edilirken,

koyun ve keçi sütü örneklerinin tamamının AFM₁ seviyesi yasal limitlerin altında bulundu. Analiz edilen inek sütlerinde tespit edilen AFM₁ seviyeleri ile koyun ve keçi sütlerindeki AFM₁ miktarı arasında belirgin istatistiksel bir farklılık olduğu (p<0.05); koyun ve keçi sütü AFM₁ seviyeleri arasında ise istatistiksel açıdan farklılık olmadığı ortaya kondu (p>0,05) (Tablo 2).

Tablo 2. Çalışmada analiz edilen örneklere ait AFM₁ düzeyleri
Table 2. AFM₁ levels in the samples analyzed in this study

Analiz Edilen Örnek	Örnek Sayısı	Örneklerdeki AFM ₁ dağılımı /(%)			AFM ₁ Konsantrasyonu (ng/L)			
		<25 ng/L	25-50 ng/L	> 50 ng/L	$\bar{X} \pm S \bar{X}$	Min	Max	F
Çiğ inek sütü	30a	26 (% 87)	1 (%3)	3 (%10)	15.88 ^a ±4.4	1.84	88.77	7
Çiğ koyun sütü	3	30 (%100)	-	-	3.91 ^b ±0.25	1.82	7.83	6
Çiğ keçi sütü	30	30 (%100)	-	-	3.07 ^b ±0.42	0.33	11.79	6
Toplam	90	86 (%96)	1 (%1)	3 (%3)				

$\bar{X} \pm S \bar{X}$: Ortalama±standart hata

^{a,b}: farklı harfler gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir (p<0.05).

TARTIŞMA

Son yıllarda, çiğ sütteki AFM₁ kontaminasyonunun izlenmesi için ülkemizin Van, Burdur, Nevşehir, Bursa, Eskişehir, Ankara, Antalya, Kars, Kilis, Kayseri ve Afyon illerinden elde edilen süt örnekleri kullanılarak birçok çalışma yapılmıştır (Bakırcı, 2001; Akdemir ve Altıntaş, 2004; Kireççi ve ark. 2007; Özdemir, 2007; Ertaş ve ark. 2011; Kara ve İnce, 2014). Haziran-Ağustos aylarında süt toplama merkezlerinden temin edilen örneklerle gerçekleştirilen bu çalışmada AFM₁ konsantrasyonu: İnek sütü örneklerinde analiz edilen örneklerin 3'ü (%10) yasal sınırların üzerinde olmak üzere 1,84-88,77 ng/L arasında; koyun sütü örneklerinde 1,82-7,83 ng/L arasında; keçi sütü örneklerinde 0,33-11,79 ng/L arasında tespit edildi. Değişik araştırmacılar tarafından çeşitli ülkelerde ve mevsimlerde yapılmış olan ve çiğ süt örneklerinde AFM₁ düzeylerine ilişkin bazı çalışmalara ait sonuçlar Tablo 3'te özet halinde verilmiştir.

Çalışmada analiz edilen çiğ inek sütlerinde AFM₁ yönünden Türkiye ve Avrupa Birliği limitlerini aşan örnek oranı (%10), bazı araştırmacılar (Ertas ve ark., 2011; Kara ve İnce, 2014; Bilandzic ve ark. 2017) tarafından saptanan değerlerden yüksek, bazıları (Akdemir ve Altıntaş 2004; Kireççi ve ark. 2007; Rahimi ve ark. 2010; Bilandzic ve ark. 2014) tarafından tespit edilen değerlerden düşük, Roussi ve ark. (2002) tarafından bulunan orana ise benzerdir (Tablo 3). Sonuçlar arasındaki farklılıklar özellikle örneklerin alındığı mevsim ve coğrafik koşullardaki farklılıkla (Tablo 3) ilişkili olabilir. Bilindiği gibi uygun olmayan koşullarda muhafaza edilen yemde üreyen küf mantarlarının meydana getirdiği AFB₁, sütteki AFM₁'in kaynağıdır. Buna bağlı olarak AFM₁'in sütteki seviyesinin yaz aylarında daha düşük olduğu, bunun sebebinin de yaz aylarında süt ineklerinin kontamine konsantre yemlerden çok taze otlarla beslenmesi olduğu belirtilmektedir (Roussi ve ark. 2002; Asi ve ark.

2012; Malissiova ve ark. 2013; Bilandzic ve ark. 2014a; Bahrami ve ark. 2016; Bilandzic ve ark. 2017). Bu çalışmada analiz edilen bazı inek sütlerinin AFM₁ kontaminasyon düzeyi, örneklerin elde edildiği süt toplama merkezlerine gelen inek sütlerinin temin edildiği işletmelerde kontamine konsantre yemlerin kullanıldığını düşündürmektedir.

Analiz edilen koyun süt örneklerindeki AFM₁ konsantrasyonunun yapılan diğer araştırmalarda elde edilen sonuçlarla (Tablo 3) ile karşılaştırıldığında bazı araştırmacıların (Finoli ve Vecchio, 2003; Kaniou-Grigoriadou ve ark. 2005; Bilandzic ve ark. 2014b; Bilandzic ve ark. 2017) bulguları ile uyumlu olarak yasal sınırların altında olduğu belirlendi. Buna karşın, Roussi ve ark. (2002) ve Rahimi ve ark. (2010) ve Fallah ve ark. (2011) bu çalışma sonuçlarından farklı olarak sırasıyla, %6.7, %3.9 ve %25'inde AFM₁ düzeylerinin yasal limitlerin üzerinde olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada incelenen keçi sütü örneklerinin AFM₁ konsantrasyonları da Roussi ve ark. (2002), Bilandzic ve ark. (2014b); Bilandzic ve ark. (2017)'nin yaptıkları çalışmaların sonuçlarıyla paralel bir şekilde ve yasal sınırların altında bulunmuştur. Buna karşılık diğer bazı araştırmacılar (Rahimi ve ark. 2010; Özdemir 2007) analiz ettikleri keçi sütlerinin yasal limitin üzerinde AFM₁ içerdiğini bildirmişlerdir (Tablo 3). Araştırma sonuçlarındaki farklılıklar, örneklerin alındığı mevsime, kullanılan analiz yöntemlerine ve hayvanların beslenme şekillerine bağlanabilir. Yapılan çalışmalar sütledeki AFM₁ düzeyinin, bölgenin mevsimsel, coğrafik ve iklim özelliklerine bağlı olarak süt veren hayvanların rasyonlarından ve laktasyon periyodundan etkilendiğini göstermektedir (Rahimi ve ark. 2010; Malissiova ve ark. 2013).

Tablo 3. Çiğ süt örneklerinde AFM₁ düzeylerine ilişkin bazı çalışma sonuçları
Table 3. Results of the some studies on AFM₁ levels in raw milk samples

Ülke	Ay	Sütün alındığı hayvan türü	AFM ₁ kontaminasyon düzeyi	Yasal limitlerin üzerindeki örnek oranı (%)	Literatür
Türkiye	Belirtilmemiş	İnek sütü	10-817 ng/L	%33.3	Akdemir ve Altıntaş (2004).
Türkiye	Ağustos-Ocak	İnek sütü	<8 ng/L	-	Kara ve İnce (2014).
Türkiye	Aralık-Şubat	İnek sütü	5-250 ng/L	%90	Kireççi ve ark. (2007).
Türkiye	Ocak-Mart	İnek sütü	1-30 ng/L	-	Ertaş ve ark. (2011).
Türkiye	Mart- Nisan	Keçi sütü	5.16-116.78 ng/L	%6.36	Özdemir (2007).
İtalya	Kasım-Haziran	Koyun sütü	4-23 ng/L	-	Finoli ve Vecchio (2003).
Yunanistan	Mart-Haziran	Koyun sütü	0-18.2 ng/L	-	Kaniou-Grigoriadou ve ark. (2005).
Yunanistan	Aralık-Mayıs	İnek sütü	<5- >50 ng/L	%3.6	
		Koyun sütü	<5- >50 ng/L	%6.7	Roussi ve ark. (2002).
		Keçi sütü	<5- <20 ng/L	-	
Hırvatistan	Temmuz-Eylül	İnek sütü	<23.2- >50 ng/L	%6.7	
		Koyun sütü	<23.2- 49.9 ng/L	-	Bilandzic ve ark. (2014b).
		Keçi sütü	<23.2- 49.9 ng/L	-	
Hırvatistan	Mart- Mayıs	İnek sütü	0.93-71.1 ng/L	%0.3	
		Koyun sütü	2.18-15.8 ng/L	-	Bilandzic ve ark. (2017).
		Keçi sütü	2.67-13.8 ng/L	-	
İran	Kasım 2007- Aralık 2008	İnek sütü	<5- >50 ng/L	%36	
		Koyun sütü	<5- >50 ng/L	%3.9	Rahimi ve ark. (2010).
		Keçi sütü	<5- >50 ng/L	%5.7	

Bu araştırma sonuçlarına uygulanan istatistik çalışmasına göre, analiz edilen inek sütlerinde tespit edilen AFM₁ seviyeleri ile koyun ve keçi sütlerindeki AFM₁ miktarı arasında istatistiksel bir farklılık olduğu ($p < 0.05$); koyun ve keçi sütü AFM₁ seviyeleri arasında ise istatistiksel açıdan farklılık olmadığı ortaya kondu ($p > 0,05$). Bahrami ve ark. (2016) İran'da yaptıkları çalışmada koyun- keçi ve koyun-inek sütleri arasında farklılık bulamadıklarını, ancak inek- keçi sütleri arasında farklılık olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışma ile uyumlu olarak keçi ve koyun sütlerinde AFM₁ kontaminasyon seviyelerinin, inek sütüyle karşılaştırıldığında, Yunanistan, İtalya, Hırvatistan, Lübnan ve İran'da da düşük bulunduğu rapor edilmektedir (Roussi ve ark. 2002; Rahimi ve ark. 2010; Malissiova ve ark. 2013; Bilandzic ve ark. 2014b; Hassan ve Kassafy 2014; Viridis ve ark. 2014; Bilandzic ve ark. 2017). Bu durum, koyun ve keçilerin ineklere oranla daha fazla dış ortamda otlatılarak beslenmesi ile ilişkilendirilebilir (Molle ve ark. 2008). Niğde Valiliği ve Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi işbirliği ile hazırlanan Niğde İl Gelişme Planı'nda (NİGEP) Niğde'deki koyun ve keçi sürülerinin

çoğunlukla otlatmaya dayalı yetiştirildiği bildirilmektedir (Anonim, 2017b).

Bu çalışmada, AFM₁ kontaminasyon düzeyi yasal sınırları aşan az sayıda örnek tespit edilmiş olsa da, AFM₁'in toplum sağlığına olabilecek olası zararlarını önlemek için AFM₁'in süt toplama merkezlerinde daha etkin bir şekilde izlenmesi gerektiği ortaya çıkmaktadır. Bu amaçla, süt üreticileri, tedarikçileri ve tüketicilerin aflatoksinlerin sağlığa zararları ve sütteki AFM₁ tehlikesi konusunda düzenli olarak bilgilendirilmeleri, olası bir halk sağlığı riskinin önlenmesinde çözüm yolu olarak önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Akdemir Ç, Altıntaş A.** Ankara'da işlenen sütlerde aflatoksin-M1 varlığının ve düzeylerinin HPLC ile araştırılması. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2004; 51:175-179.
- Anonim, 2006. European Commission.** Commission regulation (EC) No 1881 of 19 December 2006, setting maximum levels for

- certain contaminants in foodstuffs. Off J Europ Union L364:5–24.
- Anonim, 2011. TGK, Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği (29.12.2011 Tarih ve 28157 (3. Mükerrer) Sayılı RG).**
- Anonim, 2017a. International Agency for Research on Cancer (IARC). List of classifications. Erişim tarihi: 12.10. 2017. http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php**
- Anonim, 2017b Niğde İl Gelişme Planı (NİGEP). 06.02.2017 <http://www.nigdetb.org.tr/Portals/218/selection.pdf>. <http://www.ohu.edu.tr/haber/nigde-il-gelisme-plani-tanitim-toplantisi-yapildi/208>. Erişim tarihi: 15.09.2017**
- Asi MR., Iqbal SZ, Ariño A, Hussain A.** Effect of seasonal variations and lactation times on aflatoxin M₁ contamination in milk of different species from Punjab, Pakistan. *Food Contr.* 2012; 25(1): 34–38.
- Bahrani R. Shahbazi Y, Nikousefat Z.** Aflatoxin M₁ in milk and traditional dairy products from west part of Iran: occurrence and seasonal variation with an emphasis on risk assessment of human exposure. *Food Contr.* 2016; 62: 250–256.
- Bakirci I.** A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and milk products produced in Van province of Turkey. *Food Control* 2001; 12(1):47-51.
- Bilandzic N, Bozic D, Dokic M, Sedak M, Solomun Kolanovi, B., Varenina, I., Tanković S, Cvetnić Z.** Seasonal effect on aflatoxin M₁ contamination in raw and UHT milk from Croatia. *Food Contr.* 2014a; 40: 260-264.
- Bilandzic N, Luburic BD, Dokic M, Sedak M, Kolanovi SB, Varenina I, Cvetnic Z.** Assessment of aflatoxin M₁ contamination in milk of four dairy species in Croatia. *Food Contr.* 2014b; 43:18–21.
- Bilandzic N, Varenina I, Kolanovic SB, Luburic BD, Varga I, Zeljezic B, Cvetnic L, Benic M, Sanin Tankovic, Cvetnic Z.** Occurrence of aflatoxin M₁ in raw cow, goat and sheep milk during spring and autumn in Croatia during 2016. *Toxin Rev.* 2017; Early Online: 1–7. DOI: 10.1080/15569543.2017.1306785
- Codex Alimentarius.** International Food Standards. General Standard for contaminants and toxins in food and feed. Codex Stan 193-1995. Amended in 2015.
- Creppy EE.** Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett.* 2002; 127: 19-28.
- Duarte SC, Almeida AM, Teixeira AS, Pereira AL, Falcão AC, Pena A, Lino CM.** Aflatoxin M₁ in marketed milk in Portugal: Assessment of human and animal exposure. *Food Contr.* 2013; 30: 411-417.
- Ertas N, Gonulalan Z, Yildirim Y, Karadal F.** A survey of concentration of aflatoxin M₁ in dairy products marketed in Turkey. *Food Contr.* 2011; 22(12): 1956-1959.
- Fallah AA, Rahnama M Jafari T, Saei Dehkordi SS.** Seasonal variation of aflatoxin M₁ contamination in industrial and traditional Iranian dairy products. *Food Contr.* 2011; 22: 1653–1656.
- Finoli C, Vecchio A.** Occurrence of aflatoxins in feedstuff, sheep milk and dairy products in western Sicily. *Ital J Anim Sci.* 2003; 2(3): 191–196.
- Hassan HF, Kassaify Z.** The risks associated with aflatoxins M₁ occurrence in Lebanese dairy products. *Food Contr.* 2014; 37: 68–72.
- Kaniou-Grigoriadou I, Eleftheriadou A, Mouratidou T, Katikou P.** Determination of aflatoxin M₁ in ewe's milk samples and the produced curd and Feta cheese. *Food Contr.* 2005; 16: 257-261.
- Kara R, Ince S.** Aflatoxin M₁ in buffalo and cow milk in Afyonkarahisar, Turkey. *Food Addit Contam Part B* 2014; 7(1): 7-10.
- Kireççi E, Savaşçı M, Ayyıldız A.** Sarıkamış'ta tüketilen süt ve peynir ürünlerinde aflatoxin M₁ varlığının belirlenmesi. *İnfeksiyon Derg.* 2007;21(2):93- 96.
- Malissiova E, Tsakalof A, Arvanitoyannis IS, Katsfliaka A, Katsioulis A, Tserkezou P, Koureasa M, Govarise A, Hadjichristodoulou C.** Monitoring Aflatoxin M₁ levels in ewe's and goat's milk in Thessaly, Greece; potential risk factors under organic and conventional production schemes. *Food Contr.* 2013; 34: 241-248.
- Molle G, Decandia M, Cabiddu A, Landau SY, Cannas A.** An update on the nutrition of dairy sheep grazing Mediterranean pastures. *Small Ruminant Res.* 2008; 77:93-112.
- Murphy PA, Hendrich S, Landgren C, Bryant C.** Food mycotoxins: an update. *J Food Sci.* 2006; 71: R51-R65.
- Özdemir M.** Determination of Aflatoxin M₁ Levels in goat milk consumed in Kilis

Province. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2007; 54: 99-103.

Prandini A, Tansini G, Sigolo S, Filippi L, Laporta M, Piva G. On the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products. Food Chem Toxicol. 2009; 47: 984-991.

Rahimi E, Bonyadian M, Rafei M, Kazemeini HR. Occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran. Food Chem Toxicol. 2010; 48(1):129-131.

Roussi V, Govaris A, Varagouli A, Botsoglou NA. Occurrence of aflatoxin M (1) raw and market milk commercialized in Greece. Food Addit Contam. 2002; 19(9):863-868.

Sidhu OP, Chandra H, Behl HM. Occurrence of aflatoxins in mahua (*Madhuca indica* Gmel.) seeds: synergistic effect of plant extracts on inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. Food Chem Toxicol. 2009; 47(4): 774-7.

Viridis S, Scarano C, Spanu V, Murittu G, Ibba I, de Santis E. A survey on Aflatoxin M₁ content in sheep and goat milk produced in Sardinia Region, Italy (2005–2013). Ital. J Food Saf. 2014; 3: 206–209.

Submission: 09.01.2018 Accepted: 11.02.2018 Published Online: 21.02.2018

Merinos Koçlarda Spermaya Katılan Antioksidanların Kısa Süreli Saklama Sırasında Spermatolojik Parametreler ve DNA Hasarı Üzerine Etkileri[#]

Fatih AVDATEK^{1*}, Deniz YENİ¹, Mustafa GÜNDOĞAN¹

¹Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı

[#]Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 14.VF.09 nolu proje ile desteklenmiştir.

*Corresponding author e-mail: favdatek@aku.edu.tr

ÖZ

Çalışmada koç ejakülatlarının kısa süreli saklanması sürecinde sperma sulandırıcısına katılan curcumin ve eugenolün spermatolojik değerler ve DNA hasarı üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı. Çalışmada toplam 5 Merinos koçtan suni vagina ile alınan ejakülatlar kullanıldı. Başlıca spermatolojik özellikleri belirlenen normospermi kalitesindeki ejakülatlar birleştirilerek kullanıldı. Araştırma ve kontrol gruplarında spermalar mix ejakülat biçiminde değerlendirildi. Spermaların sulandırılması ve dozlanması, farklı curcumin (0,5, 1 ve 2 mM) ve eugenol (0,5, 1 ve 2 mM) dozları Tris ana sulandırıcısı ile yapıldı. Ayrıca antioksidan içermeyen kontrol grubu da oluşturuldu. Sulandırma işlemini takiben örneklerin +5 °C'deki 0. saat spermatozoon motilitesi, morfolojik muayene, membran bütünlüğü (HOST-Eozin testi) ve DNA hasarı belirlenip daha sonra müteakip zamanlar olan 24., 48. ve 72. saatteki spermatolojik ve DNA hasarı değişimleri kaydedildi. Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre curcuminin 0.5 mM ile 1 mM ve eugenolün 1 mM lık gruplarının spermatozoon motilitesi, anormal spermatozoon oranları, HE test oranları ve DNA hasarı yönünden kontrol grubu ve diğer gruplara göre istatistik açıdan (p<0.05) en iyi korumayı sağladığı görüldü. Her iki antioksidan maddenin koç spermasının kısa süreli saklanması amacıyla kullanılan sulandırıcıya katılmasında yararlı olacağı kanısına varıldı. Ayrıca literatür taramalarında söz konusu antioksidanlardan eugenol ile ilgili spermatolojik parametrelere dair verilere rastlanmadığından konuyla ilgili daha geniş hayvan materyalleri ile başka çalışmaların yapılmasına gereksinim duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Curcumin, DNA hasarı, Eugenol, Kısa süreli saklama, Koç sperma

The Effects of Antioxidants Supplementation on Spermatological Parameters and DNA Damage in Liquid Storage Process in Merinos Ram Semen

ABSTRACT

The aim of this study is to investigate the effects of different doses Curcumin and Eugenol adding to extender on some spermatological parameters and DNA damage during liquid storage of ram semen. The ejaculate samples collected by artificial vagina from 5 Merino rams. Determined principle spermatological properties and having/with normospermic quality will pooled. Samples will evaluated as mix ejaculate in the experiment and control groups. The semen samples which were diluted with a Tris-based extender containing additives including curcumine(0,5, 1 ve 2 mM) and eugenol (0,5, 1 ve 2 mM), and extender containing no antioxidant (control) were constitute. After diluted semen samples will evaluated in point of spermatozoa motility, morphological examination, membrane integrity (HE test) and DNA damage at +5°C for 0. 24, 48 and 72 hours of storage. According to our study, curcuminin 0.5 mM to 1 mM and eugenolin 1 mM groups showed the best protection against spermatozoon motility, abnormal spermatozoon rates, HOST-Eosin test ratios and DNA damage in the control group and other groups (p<0.05). It was concluded that both substances would be useful for the diluent used for short-term storage of ram sperm. Since there is no evidence of eugenol-related spermatological parameters in antioxidants mentioned in the literature, it is necessary to carry out further studies with larger animal materials related to the subject.

Keywords: Curcumine, DNA damage, Eugenol, Short-term storage, Ram semen

To cite this article: Avdatek F, Yeni D, Gundogan M. Merinos Koçlarda Spermaya Katılan Antioksidanların Kısa Süreli Saklama Sırasında Spermatolojik Parametreler ve DNA Hasarı Üzerine Etkileri. Kocatepe Vet J. (2018) 11(2): 126-133.

GİRİŞ

Kısa süreli saklama metodunun esasını sıvı durumda olan spermanın ısısının belirli derecelere kadar düşürülmesi (0-5°C veya 10-15°C) ve bu derecelerde spermatozoanın reversible olarak inaktive edilmesi oluşturmaktadır. Kısa süreli saklama için en uygun olan ısı dereceleri üzerine şimdiye kadar çeşitli görüşler ortaya atılmıştır. Bazı araştırmacılar kısa süreli (likit saklama) saklama için en uygun sıcaklıkların 10-15°C olduğunu (Salamon ve Maxwell 2000), bazıları da koç ve boğa spermalarının canlılıklarını devam ettirebilmeleri için 0-5°C'lerin daha iyi olduğunu belirtmişlerdir (Johnson ve ark. 2000, Huo ve ark. 2002).

Spermatozoonlarda irreversible bozukluklar meydana getirebilen ani ısı değişikliklerine soğuk şoku adı verilir. Spermayı düşük ısılarda saklarken soğuk şokuna uğrayabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle spermatolojik özellikleri belirlenmiş ve sulandırılmış spermanın 5°C'ye soğutulması sırasında çok dikkatli olunmalıdır. Çünkü 17°C'nin altındaki ani ısı değişikliklerinde özellikle spermanın akrozomunda olmak üzere irreversible bozukluklar meydana gelebilecektir. Sonuçta oluşabilecek değişiklikler spermanın potansiyel fertilitasını düşürebilir niteliktedir (Maxwell ve Salamon 1993).

Soğuk şoku, spermatozoanın motilite ve fertilitate gücünün azalmasına sebep olan önemli etkenler arasındadır. Spermatozoa plazma membranı, akrozom ve mitokondri bölümleri soğuk şokuna karşı oldukça duyarlı yapılardır. Soğuk şoku sonucu spermatozoa membran bütünlüğünün bozulmasıyla birlikte potasyum, adenosin trifosfat (ATP), lipoproteinler, enzimler ve diğer önemli hücre içi yapıların hücreden dışarıya sızabileceği bildirilmektedir (Cupps 1991). Kısa süreli saklama tekniğiyle spermayı 2-3 gün süreyle saklamak mümkün olabilmektedir. Ancak, zamana bağlı olarak 4-8 saatten sonra motilitede sürekli bir azalma ve morfolojik bozukluklarda artma meydana gelmektedir. Yapılan bir çalışmada ise, kısa süreli saklanan koç spermasının mitokondriyal aktivitesinin ve akrozomal bütünlüğünün azaldığı tespit edilmiştir (Güngör ve ark. 2017). Süre uzadıkça spermanın kalitesinde meydana gelen bu azalma, dikkate alınması gereken bir durumdur. Saklama süresince her gün spermanın motilite ve morfolojik muayenelerinin yapılması ve tohumlama dozunun bulgulara göre yeniden hesaplanmasının yararlı olacağı bildirilmektedir (Maxwell ve Saloman 1993).

Kısa süreli saklamalarda sulandırıcının kompozisyonu, sulandırma oranı, saklama ısısı ve şartlarıyla ilişkili olmaksızın, sadece saklama süresinin uzamasına bağlı olarak da spermatozoa zarar görebilmektedir. Saklama sırasında ortaya çıkan başlıca değişiklikler, spermatozoanın motilitesinin azalması ve morfolojik bütünlüğünün bozulması olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu değişikliklere spermatozoanın plazma membranında lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan reaktif oksijen türleri (serbest oksijen radikalleri) olarak bilinen toksik metabolizma ürünlerinin birikimi de olumsuz yönde etkilemektedir. Bu olaylar sonucunda da, spermatozoanın dişi genital kanalında yaşam süresinin kısalması ve transportunun gerçekleşmemesi ve fertilitate düşüşler ortaya çıkmaktadır (Maxwell ve Saloman 1993, Maxwell ve Stojanov 1996). Bununla beraber kısa süreli saklama sürecinde DNA hasarında artışlar meydana gelerek bu da infertilite, kusurlu embriyonel gelişim, implantasyon kusuru ve tekrarlayan abortlara neden olmaktadır (Gündoğan ve ark. 2010).

Güçlü bir antioksidan olan zerdaçal, curcumin, B-karoten, vitamin E ve vitamin C maddelerini içermektedir. Zerdaçalın en önemli bileşeni olan curcumin kuvvetli bir antioksidan olma özelliğinin yanında kolesterolü düşürdüğü, virus, bakteri ve paraziter etkenlere karşı etkili olduğu, yangı ve immun sistem mekanizmaları üzerine pozitif etkilerinin olduğu da belirtilmektedir (Sharma ve ark. 2001). Curcumin içerdiği hidroksil grupları sayesinde antioksidan özelliğine sahip polifenoldür (Gupta ve ark. 2009). Antioksidan özelliğinden dolayı oksidatif strese yol açan çeşitli radikallere karşı DNA'yı koruduğu (Reddy ve Lokesh 1994, Ahsan ve ark. 1999), kanserojen maddelerin vücuttan atılmasında görev alarak DNA'yı zararlı etkenlere karşı koruyan enzimlerin aktivasyonunda rolleri olduğu belirtilmektedir (Koo ve ark. 2004). Eugenol, defneyaprağı, yenibahar ve syzygium bitki türünden köken alan karanfil yağında bulunan kısa hidrokarbon zinciri olan bir metoksifenoldür (Ito ve ark. 2005). Eugenol ve isoeugenolün antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Çeşitli antioksidan sistemler ile oksidatif uyarılma arasındaki denge bozulduğunda oksidatif stres meydana gelmektedir (Atsumi ve ark. 2005). Eugenol mitokondriyal membran dahil ve zincir kırıcı ajan olarak görev yapar, lipid peroksidasyonu inhibe ederek antioksidan etkinliğini göstermektedir (Nagababu ve ark. 2010).

Çalışma, Merinos koçların spermalarının kısa süreli saklanması spermata sulandırıcılarına katılan curcumin ve eugenolün farklı konsantrasyonlarının 0., 24., 48. ve 72. saatlerdeki spermatolojik özelliklere ve DNA hasarı üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yapıldı.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada hayvan materyali olarak Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvancılık Uygulama ve Araştırma Merkezinde yetiştirilen 2-3 yaşlarındaki Merinos ırkı 5 baş koç kullanıldı. Çalışma süresince hayvanlara yapılan tüm müdahaleler Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu tarafından bildirilen kurallar doğrultusunda 08/05/2014 tarihli, (AKÜHADYEK 344-14) referans no'lu ve 56 sayılı etik kurul onayı ile gerçekleştirildi. Aşım sezonunda, haftada iki kez olmak üzere her bir koçtan toplam 6 ejakulat toplandı. Çalışmada sulandırıcı olarak Tris (Trisma base 3,63 g, sitrik asit 1,99 g, fruktoz 0,50 g) kullanılmış olup daha sonra farklı konsantrasyonlarda curcumin (0,5, 1 ve 2 mM) ve eugenol (0,5, 1 ve 2 mM) ve herhangi bir antioksidan eklenmeyerek (kontrol) 7 farklı grup oluşturuldu. Her bir koçtan alınan sperma örnekleri birleştirilerek spermatolojik muayeneleri yapıldı ve 7 eşit hacme ayrıldı. Sulandırılmış sperma grupları 5°C'de 2-2.5 saat ekilibre edildikten sonra çalışma süresince aynı derecede muhafaza edildi. Ekilibrasyon sonrası 0. saat kabul edilerek 0., 24., 48. ve 72. saatlerde spermatolojik parametreler ve DNA hasarı yönünden değerlendirmeler yapılarak kaydedildi. Çalışma süresi boyunca sperma örnekleri +5 C⁰'de saklandı ve bu işlem 6 kez tekrarlandı.

Spermatolojik Muayeneler

Sperma motilitesi 37°C'ta ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopta (Olympus CX31, Olympus Optical Co., Ltd., Japan) 400x büyütmede en az 5 farklı alanın ortalaması alınarak % olarak kaydedildi. Anormal spermatozoon oranı Giemsa boyama yöntemiyle immersiyon objektif altında (1000x) belirlenerek farklı spermatozoon bölümlerine (baş, orta kısım ve kuyruk) ait bozukluklar % olarak kaydedildi (Watson 1975). Spermatozoon membran bütünlüğü ve canlılığının belirlenmesi amacıyla HOST-E testi Gündoğan ve ark. (2011) metodu kullanılarak yapıldı. Bunun için, sperma örneklerinin 100 mOsm/l'te ayarlanmış fruktoz solüsyonu içerisine % 1'lik eozin-Y ilave edildi ve 35°C de 30 dakika inkübe edilerek sonrasında froti çekildi. Hazırlanan slaytlardan toplam 200 hücre spermatozoon başının boya alma ve spermatozoon kuyruğunun kıvrılma durumuna

göre dört tip de (Tip I: kuyruk şişmiş ve baş boya almamış, HOS + /E- ;Tip II: kuyruk şişmemiş ve baş boya almamış, HOS- / E-; Tip III: kuyruk şişmiş ve baş boya almış, HOS + / E +; Tip IV: kuyruk şişmemiş ve baş boya almış, HOS- / E +) değerlendirildi. Spermatozondaki DNA hasarının belirlenmesinde Single Cell Gel Electrophoresis (COMET) (Ostling ve Johanson, 1984; Singh ve ark., 2003) metoduna göre görsel skorlama (AU) ile değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandı. Her bir tekrar için tanımlayıcı istatistikler hesaplanarak ortalama±standart hata ($\bar{X} \pm SEM$) belirlendi. Gruplar arası farkın önemini belirlemek için Post-hoc Duncan testi kullanıldı. Analizler bilgisayar ortamında SPSS (16.0) paket programında gerçekleştirildi.

BULGULAR

0. Saat Spermatolojik Parametreler ve DNA

Hasarı Bulguları

Çalışmada 0. saatte elde edilen ortalama spermatolojik parametreler ve DNA hasarı oranları Tablo 1' de verilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda, 0. saatte motilite, anormal spermatozoon baş, orta, kuyruk oranlarında, H+E- oranlarında ve DNA hasarında kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak bir fark olmadığı gözlemlendi (p<0,05).

24. Saat Spermatolojik Parametreler ve DNA

Hasarı Bulguları

Araştırmamızda 24. saatte elde edilen ortalama spermatolojik parametreler ve DNA hasarı oranları Tablo 2' de verilmiştir. 24. saatte elde edilen motilite, anormal spermatozoon baş, kuyruk, orta kısım, H+E- oranlarında ve DNA hasarında oranlarında kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak bir fark olmadığı belirlendi (p<0,05).

48. Saat Spermatolojik Parametreler ve DNA

Hasarı Bulguları

48. saatte elde edilen ortalama spermatolojik parametreler ve DNA hasarı oranları Tablo 3' de verilmiştir. 48. saatte elde edilen motilite ve başa bağlı anormal spermatozoa oranlarında kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak bir fark olmadığı görülürken (P>0,05); orta kısım anormal spermatozoa oranları bakımından eugenol 1 mM gruptaki azalma kontrol göre istatistiki açıdan önemli bulundu (p<0,05). H+E- oranları

açısından kontrole göre 1 mM eugenol gurubundaki artış ve DNA hasarı açısından 1 mM eugenol gurubundaki azalma istatistiki açıdan önemli bulundu ($p < 0,05$).

Tablo 1. Çalışmada 0. saatte elde edilen ortalama ($X \pm SEM$) spermatojolojik parametreler ve DNA hasarı oranları.
Table 1. Mean ($X \pm SEM$) spermatological parameters and DNA damage rates obtained at 0 hours in the study.

Grup (n=6)	Motilite (%)	Anormal Spermatozoon Oranı			H+E- (%)	H-E- (%)	H+E+ (%)	H-E+ (%)	DNA HASARI (AU)
		Baş (%)	Orta (%)	Kuyruk (%)					
Kontrol	83,3±2,10 ^{ab}	0,4±0,32	1,9±0,35	3,6±0,27	67,6±4,46	13,3±1,60	11,1±2,94	7,8±1,77	38,8±4,72 ^{ab}
Curcumin 0,5 mM	85,0±2,23 ^{ab}	0,4±0,15	1,8±0,24	3,4±0,50	68,5±3,65	14,0±1,65	9,2±2,67	8,3±1,45	29,5±0,61 ^{ab}
Curcumin 1 mM	86,6±2,10 ^{ab}	0,1±0,08	1,4±0,23	3,5±0,27	64,5±2,55	13,3±0,71	11,6±2,24	10,5±1,45	30,1±6,70 ^{ab}
Curcumin 2 mM	85,0±2,23 ^{ab}	0,1±0,10	1,5±0,25	3,7±0,17	60,0±3,82	14,8±1,74	15,5±4,13	9,6±1,25	31,0±5,00 ^{ab}
Eugenol 0,5 mM	81,6±1,66 ^b	0,2±0,11	1,7±0,28	3,5±0,44	67,3±3,66	15,0±2,14	10,3±2,75	7,3±1,30	30,6±4,55 ^{ab}
Eugenol 1 mM	88,3±1,66 ^a	0,3±0,16	1,4±0,20	3,2±0,28	66,6±3,29	16,6±1,68	9,6±1,87	7,5±1,52	26,3±3,50 ^b
Eugenol 2 mM	83,3±2,10 ^{ab}	0,1±0,08	2,3±0,51	4,2±0,47	59,5±3,01	16,8±1,75	13,0±1,52	10,6±1,02	42,2±5,68 ^a

a-b: Herbir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki açıdan önemlidir ($p < 0,05$).

Tablo 2. Çalışmada 24. saatte elde edilen ortalama ($X \pm SEM$) spermatojolojik parametreler ve DNA hasarı oranları.
Table 2. Mean ($X \pm SEM$) spermatological parameters and DNA damage rates obtained at 24 hours in the study

Gruplar (n=6)	Motilite (%)	Anormal Spermatozoon Oranı			H+E- (%)	H-E- (%)	H+E+ (%)	H-E+ (%)	DNA HASARI (AU))
		Baş (%)	Orta (%)	Kuyruk (%)					
Kontrol	73,3±2,11 ^{ab}	0,4±0,72	1,6±0,41	4,3±0,46 ^{ab}	61,0±4,76	16,5±0,76	10,8±2,62 ^b	11,6±2,61	69,0±5,25
Curcumin 0,5 mM	75,0±2,23 ^{ab}	0,4±0,15	1,7±0,16	3,9±0,30 ^b	57,6±3,09	18,5±1,60	10,6±2,40 ^b	13,1±1,07	48,1±4,98
Curcumin 1 mM	76,6±2,11 ^{ab}	0,1±0,08	1,7±0,50	4,4±0,69 ^{ab}	56,3±3,43	18,5±2,17	11,6±2,36 ^b	13,5±1,91	49,1±7,66
Curcumin 2 mM	71,6±1,66 ^b	0,2±0,10	2,0±0,37	5,2±0,84 ^{ab}	51,8±3,26	14,5±0,71	19,6±3,29 ^a	14,5±1,78	59,0±10,57
Eugenol 0,5 mM	73,3±2,11 ^{ab}	0,2±0,11	1,7±0,40	4,4±0,91 ^{ab}	57,5±4,20	16,8±0,98	11,8±1,53 ^b	13,8±2,67	58,0±8,79
Eugenol 1 mM	78,3±1,66 ^a	0,3±0,16	2,0±0,30	4,0±0,58 ^b	60,1±3,97	16,3±2,53	12,5±1,08 ^b	11,0±1,57	50,1±7,39
Eugenol 2 mM	73,3±2,11 ^{ab}	0,1±0,08	2,3±0,21	6,4±0,75 ^a	54,8±0,87	17,1±1,42	14,0±1,69 ^{ab}	14,0±0,73	58,8±8,70

a-b: Herbir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki açıdan önemlidir ($p < 0,05$).

Tablo 3. Çalışmada 48. saatte elde edilen ortalama ($X \pm SEM$) spermatojistik parametreler ve DNA hasarı oranları
Table 3. Mean ($X \pm SEM$) spermatological parameters and DNA damage rates obtained at 48 hours in the study

Gruplar (n=6)	Motilite (%)	Anormal Spermatozoon Oranı			H+E- (%)	H-E- (%)	H+E+ (%)	H-E+ (%)	DNA HASARI (AU)
		Baş (%)	Orta (%)	Kuyruk (%)					
Kontrol	53,3±2,10	0,5±0,13	2,6±0,52 ^{ab}	5,9±1,13	42,7±2,10 ^{bc}	17,0±1,63	23,3±2,70 ^{ab}	17,0±1,50 ^{ab}	109,3±3,48 ^a
Curcumin 0,5 mM	58,3±3,07	0,2±0,10	2,7±0,25 ^{ab}	5,3±0,73	52,3±4,16 ^{ab}	14,8±2,45	20,0±2,38 ^{ab}	12,8±1,78 ^b	87,8±4,64 ^{bc}
Curcumin 1 mM	58,3±1,67	0,4±0,15	1,7±0,28 ^b	6,2±1,13	46,1±2,83 ^{abc}	16,3±2,07	21,1±3,17 ^{ab}	16,3±1,52 ^{ab}	87,8±3,99 ^{bc}
Curcumin 2 mM	53,3±3,33	0,3±0,17	2,4±0,53 ^{ab}	6,5±1,30	41,8±4,30 ^{bc}	17,0±2,73	24,0±4,39 ^a	17,2±1,70 ^{ab}	98,3±7,10 ^{ab}
Eugenol 0,5 mM	58,3±3,07	0,2±0,10	2,2±0,42 ^{ab}	5,1±0,95	53,6±2,86 ^a	16,1±2,42	16,3±2,71 ^{ab}	13,8±2,02 ^b	87,5±4,83 ^{bc}
Eugenol 1 mM	61,6±1,67	0,3±0,17	2,3±0,30 ^{ab}	4,4±0,53	54,6±3,80 ^a	18,6±1,80	13,3±2,74 ^b	13,3±1,83 ^b	75,8±6,23 ^c
Eugenol 2 mM	55,0±3,41	0,2±0,17	3,4±0,37 ^a	6,5±0,75	41,3±2,95 ^c	16,0±1,29	23,3±3,48 ^{ab}	19,3±1,62 ^a	100,8±4,97 ^{ab}

a-c: Herbir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler istatistiki açıdan önemlidir ($p < 0.05$).

72. Saat Spermatojistik Parametreler ve DNA Hasarı Bulguları

Çalışmada 72. saatte elde edilen ortalama spermatojistik parametreler ve DNA hasarı oranları Tablo 4' de verilmiştir. 72. saatte elde edilen motilite, anormal spermatozoon baş ve kuyruk oranlarında kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak bir fark olmadığı

gözlemlenmiştir ($p < 0,05$). H+E- oranları açısından kontrole göre 0.5 ve 1 mM eugenol gurubundaki artış ile DNA hasarı açısından curcumin 0.5 mM ve 1mM ile eugenol 0.5 mM ve eugenol 1 mM gruplarda elde edilen azalma kontrol ve diğer gruplara göre istatistiki açıdan önemli bulundu ($p < 0,05$).

Tablo 4. Çalışmada 72. saatte elde edilen ortalama ($X \pm SEM$) spermatojistik parametreler ve DNA hasarı oranları
Table 4. Mean ($X \pm SEM$) spermatological parameters and DNA damage rates obtained at 72 hours in the study

Gruplar (n=6)	Motilite (%)	Anormal Spermatozoon Oranı			H+E- (%)	H-E- (%)	H+E+ (%)	H-E+ (%)	DNA HASARI (AU)
		Baş (%)	Orta (%)	Kuyruk (%)					
Kontrol	63,3±2,10	0,3±0,16	2,4±0,47 ^a	5,7±0,87 ^{ab}	49,3±3,33 ^{abc}	15,5±2,02	18,8±2,95 ^a	16,3±1,58	90,3±6,80 ^a
Curcumin 0,5 mM	65,0±2,23	0,2±0,10	1,7±0,31 ^{ab}	4,4±0,57 ^{ab}	55,1±2,53 ^{ab}	17,0±2,23	14,6±1,92 ^{ab}	13,1±2,42	73,1±5,58 ^{ab}
Curcumin 1 mM	66,6±2,11	0,2±0,11	2,2±0,48 ^{ab}	4,7±0,77 ^{ab}	53,8±3,99 ^{abc}	15,0±2,30	16,5±4,01 ^{ab}	14,6±0,98	76,3±3,41 ^{ab}
Curcumin 2 mM	63,3±3,33	0,2±0,16	2,1±0,27 ^{ab}	4,7±1,17 ^{ab}	46,6±3,40 ^{bc}	15,6±2,13	18,1±2,31 ^a	19,5±2,30	89,5±6,52 ^a
Eugenol 0,5 mM	65,0±2,24	0,2±0,10	1,9±0,15 ^{ab}	4,2±0,50 ^{ab}	53,6±1,90 ^{abc}	13,3±1,68	14,6±1,70 ^{ab}	18,3±1,66	73,6±6,14 ^{ab}
Eugenol 1 mM	68,3±1,66	0,2±0,11	1,2±0,21 ^b	3,2±0,30 ^b	58,3±3,72 ^a	17,0±1,21	10,3±1,58 ^b	15,3±1,94	63,6±4,22 ^b
Eugenol 2 mM	65,0±3,41	0,2±0,17	2,7±0,42 ^a	5,9±0,77 ^a	44,3±3,97 ^c	17,0±1,86	19,0±1,48 ^a	18,5±2,67	82,3±7,60 ^{ab}

a-c: Herbir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki açıdan önemlidir ($p < 0.05$).

TARTIŞMA

Türkiye’de mevcut koyun popülasyonunun önemli bir kısmının verim düzeyinin düşük olması nedeniyle ıslah edilmesi ve verimlerinin artırılması gerekmektedir. Bunun da başlıca yolu, yüksek verimli ve sağlıklı koçların spermalarını kullanarak suni tohumlama yapmaktır. Bu amaçla spermanın saklanması da önemli bir avantaj ve kolaylık sağlayacaktır. Bu alanda en geçerli ve en uygun yöntem koç spermasının kısa ve uzun süreli saklanmasıdır. Ancak uzun süreli saklama koçlarda sığırlarda olduğu gibi başarılı biçimde ve yüksek fertilité oranlarıyla uygulanmadığı için koyunlarda henüz arzu edilen sonuçlara ulaşılamamıştır. Bunun başlıca nedenleri arasında halen koç spermatozoonlarının dondurma-çözdürme süreci içerisinde yüksek oranda ölmesi, düşük ısılarla daha duyarlı olması ve koç spermatozoon membranlarının yüksek oranda doymamış yağ asidi içermeleri nedeniyle daha kırılabilir bir yapı göstermesi sayılabilir. Bu sebeplerden dolayı koçlarda spermanın kısa süreli saklanarak kullanılmasının uygun olabileceği kanısına varılmıştır.

Spermanın kısa süreli saklanması sırasında hücreler lipid peroksidasyona maruz kalabilmekte ve bunun sonucu olarak spermatozoon motilitesinde ve membran bütünlüğünde kayıplar ve fertilité oranlarında düşmeler yaşanmaktadır (Salamon ve Maxwell, 2000). Bu tür yan etkileri, sperma sulandırıcılarına bazı antioksidanların ve lipid formlarının eklenmesi ile ortadan kaldırılmaya çalışılmaktadır (Lopez-Saaz ve ark. 2000, Yıldız ve Daşkın 2004, Bucak ve ark. 2007, İnanç ve ark. 2017).

Araştırmamızda 0., 24., 48. ve 72. saat bulgularına bakıldığında 0.5 ile 1 mM curcumin’in sperma sulandırıcısına ilave edilmesi sonucunda gruplardaki spermatolojik parametreler ve DNA hasarı yönünden değerlendirildiğinde spermanın kısa süreli saklanmasında etkili olabileceği belirlendi.

Ömür (2011) Merinos koçlarda yaptığı çalışmada tris bazlı sperma sulandırıcısına ilave ettiği curcuminin 1, 2 ve 4 mM’lık konsantrasyonlarda ekilibrasyon sonrası motilité değerleri ve HOS test değerleri çalışmamızda bulduğumuz motilité ve HOS test değerleri ile paralellik arz ederken anormal spermatozoon oranı açısından çalışmamızda elde ettiğimiz değerlerden yüksek bulunmuştur. Bucak ve ark (2012) boğa sperma sulandırıcısına farklı antioksidanları farklı konsantrasyonlarda ilave ettikleri çalışmalarında çözüm sonrası kontrole göre curcumin içeren grubun spermatolojik parametrelere ve oksidatif stres parametrelerine olumlu yönde katkı yaptığını

bildirmektedirler. Çalışmada curcumin grubunda elde edilen anormal spermatozoon oranları ile çalışmamızda elde ettiğimiz değerler uyumlu bulunmuştur. Bucak ve ark (2010) Ankara keçisi üzerine yaptıkları çalışmalarında tris bazlı sperma sulandırıcısına curcumin (2.5, 5, 10 mM), inositol (2.5, 5, 10 mM), karnitin (2.5, 5, 10 mM) ilave etmişler ve çözüm sonrası 2.5 mM curcumin grubundan % 65 motilité elde ederek kontrol ve diğer antioksidan guruplarına göre anlamlı oranda koruma sağladığını bildirmektedir. Shah ve ark. (2017) manda sperma sulandırıcısına farklı dozlarda curcumin ilave ettikleri çalışmalarında çözüm sonu spermatolojik, CASA ve oksidatif stres parametreleri açısından 1.5 mM curcumin içeren grubun kontrole göre daha iyi bir koruyucu etkisi olduğunu bildirmektedirler. Elde edilen veriler çalışmamız ile paralel olduğu görülmektedir. Ancak DNA hasarı açısından curcumin içeren tüm grupların kontrol grubuna göre daha fazla hasar oluşturduğunu bildirmektedirler. Çalışmamızda curcumin içeren guruplar DNA hasarını azaltıcı bir etki ortaya koymuşlardır. Bu farklılık DNA hasarının belirlenmesinde kullanılan yöntemden, kullanılan sulandırıcı kompozisyonundan, hayvan türünden ve çalışma metodundan meydana gelmiş olabilir.

Tvrđá ve ark (2016) boğa spermasını ferrous ascorbate – FeAA ile 6 saat inkübe ederek oksidatif stresi uyardıkları çalışmalarında medyuma ilave edilen curcuminin oksidatif stresi azalttığı ayrıca spermatolojik parametreleri de iyileştirdiğini bildirmektedirler. Oğuztürk ve ark. (2012) akut kadmiyum toksitesi oluşturdukları çalışmalarında ratlara koruyucu madde olarak curcumin verdikleri araştırmalarında curcuminin toksiteden dolayı oluşan infertiliteyi ve yan etkileri ortadan kaldırdığını bildirmektedirler. Karbalay-Doust ve Noorafshan (2011) farelerde metronidazolün terapötik ve yüksek dozunu uyguladıkları çalışmalarında spermatozoon sayısında, motilitéde ve testosteron seviyelerindeki azalmayı farelere koruyucu olarak verdikleri curcumin ile ortadan kaldırarak iyileşmenin olduğunu bildirmektedirler. Abarikwu ve ark. (2014) ratlarda gallik asit toksitesine karşı koruyucu olarak curcumin uyguladıkları çalışmalarında curcuminin reproduktif aktiviteyi, antioksidan savunma sistemini ve testiküler doku hasarını azaltarak olumlu yönde katkı yaptığını bulmuşlardır. Mathuria ve Verma (2008) aflotoksin ile indüklenen farelerde koruyucu madde olarak curcumin uyguladıkları çalışmalarında aflotoksinin spermatozoon sayısında, motilitesinde ve morfolojisinde oluşturduğu hasarı curcuminin iyileştirdiğini bildirmektedirler. Farombi ve ark. (2007) ratlarda di-n-bütülfalal ile indükleyerek oluşturdukları toksite çalışmasında koruyucu madde olarak uyguladıkları curcumin ve

kolavironun testiküler oksidatif hasarı iyileştirici etkisi olduğu bildirilmektedir.

Araştırmamızda 0., 24., 48. ve 72. saat bulgularına bakıldığında 1 mM dozunda sperma sulandırıcısına ilave edilen eugenolün gruplardaki motilite, anormal spermatozoon oranları, HOST-Eozin test oranları ve DNA hasarı yönünden değerlendirildiğinde spermanın kısa süreli saklanması etkili olacağı belirlendi. Türk ve ark (2015)'nin Japon bildircinlerinde yaptıkları çalışmada başlıca bileşenleri sinnamaldehit, benzil alkol ve eugenol olan Cinnamomum zeylanicum yağı ile yaptıkları çalışmada sıcaklık stresi kaynaklı lipid peroksidasyon hasarına karşı testis dokusunu koruduğunu bildirmişlerdir. Yapılan literatür taramasında, Türk ve ark.'larının (2015) yaptıkları çalışma dışında; sperma veya başka bir hücre hasarı ile ilgili her hangi bir literatüre rastlanmadı.

Sonuç olarak yaptığımız çalışmada koç spermanın kısa süreli saklanması spermaya katılan farklı dozlardaki curcuminin 0.5 mM ile 1 mM ve eugenolün 1 mM lik gruplarının spermatozoon motilitesi, anormal spermatozoon oranları, HOST-Eozin test oranları ve DNA hasarı yönünden kontrol grubu ve diğer gruplara göre en iyi korumayı sağladığı görüldü. Literatür taramalarında söz konusu antioksidanlardan eugenol ile ilgili spermatolojik parametrelere dair verilere rastlanmadığından konuyla ilgili hem koç spermasının hem de diğer hayvan türlerine ait spermalar üzerine çalışmaların yapılmasına gerek duyulmaktadır. Ayrıca, eugenol'ün koç sperması üzerine etkileri ile yapılan ilk çalışma olması da araştırmaya orijinallik katmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abarikwu SO, Akiri OF, Durojaiye MA, Alabi AF.** Combined administration of curcumin and gallic acid inhibits gallic acid-induced suppression of steroidogenesis, sperm output, antioxidant defenses and inflammatory responsive genes. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology.* 2014; 143: 49–60.
- Ahsan H, Parveen N, Khan N, Hadi SM.** Pro-oxidant, anti-oxidant and cleavage activities on DNA of curcumin and its derivatives demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Chemico-Biological Interactions.* 1999; 121(2): 161-175.
- Atsumi T, Fujisawa S, Tonosaki KA.** comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidation conditions. *Toxicology in Vitro.* 2005; 19: 1025–1033.
- Bucak MN, Başpınar N, Tuncer PB, Çoyan K, Sarıözkan S, Akalın PP, Büyükleblebici S, Küçükğünay S.** Effects of curcumin and dithioerythritol on frozen-thawed bovine semen. *Andrologia.* 2012; 44:102–109.
- Bucak MN, Tekin N, Kulaksız R.** Koç spermasının kısa süreli saklanması antioksidanların etkisi. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi.* 2007; 47: 15-21.
- Bucak MN, Sarıözkan S, Tuncer PB, Sakin F, Ateşşahin A, Kulaksız R, Çevik M.** The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Research.* 2010; 89: 24-30.
- Cupps PT.** *Reproduction in Domestic Animals.* 4th ed. Academic Press, 1991; San Diego, CA.
- Farombi EO, Abarikwu SO, Adedara IA, Oyeyemi MO.** Curcumin and Kolaviron Ameliorate Di-n-Butylphthalate-Induced Testicular Damage in Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology,* 2007; 100: 43–48.
- Gupta A, Vij G, Sharma S, Tirekey N, Rishi P, Chopra K.** Curcumin, a polyphenolic antioxidant, attenuates chronic fatigue syndrome In murine water immersion stress model. *Immunobiology.* 2009; 214(1): 33-39.
- Gündoğan, M., Yeni, D., Avdatek, F., Fidan, A.F.** Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. *Anim. Reprod. Sci.* 2010; 122: 200-207.
- Gündoğan M, Avdatek F, Yeni D.** Effect of extenders on motility, morphology and osmotic resistance parameters of ram sperm during liquid storage. *Revue Méd. Vét.* 2011; 162(11): 546-551.
- Güngör Ş, Öztürk C, Ömür AD.** Positive effects of trehalose and cysteine on ram semen parameters. *Veterinari Medicina.* 2017; 62: 245-252.
- Huo LJ, Yue KZ, Yang ZM.** Characterization of viability, mitochondrial activity, acrosomal integrity and capacitation status in boar sperm during in vitro storage at different ambient temperatures. *Reprod Fert Develop.* 2002; 14: 509–514.

- Ito M, Murakami K, Yoshino M.** Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. *Food and Chemical Toxicology* 2005; 43: 461–466.
- İnanç ME, Tekin K, Olğaç KT, Özen D, Stelletta C, Uysal O, Daşkın A.** Effect of 7-dehydrocholesterol and cholesterol-loaded cyclodextrins on bull sperm motility during short term storage. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 2017; 23(4): 661-664.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC.** Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci.* 2000; 62: 143–172.
- Karbalay-Doust S, Noorafshan A.** Ameliorative Effects of Curcumin on the Spermatozoon Tail Length, Count, Motility and Testosterone Serum Level in Metronidazole-treated Mice. *Prague Medical Report.* 2011; 112(4):288–297.
- Koo JY, Kim HJ, Jung KO, Park KY.** Curcumin inhibits the growth of AGS human gastric carcinoma cells in vitro and shows synergism with 5-flourouracil. *J Med Food.* 2004;7: 117-121.
- Lopez-Saaz A, Ortiz N, Gallego L, Garde JJ.** Liquid storage (5°C) of ram semen in different diluents. *Arch. Androl.* 2000; 44: 155-164.
- Mathuria N, Verma RJ.** Curcumin ameliorates aflatoxin-induced toxicity in mice spermatozoa. *Fertility and Sterility.* 2008; 90(3): 775-779.
- Maxwell WMC, Salamon S.** Liquid storage of ram semen. *Reprod. Fertil. Dev.* 1993; 5: 613-638.
- Maxwell WMC, Stojanov T.** Liquid storage of ram semen in the absence of some antioxidants. *Reprod. Fertil. Dev.* 1996; 8: 1013-1020.
- Nagababu E, Rifkind JM, Sesikeran B, Lakshmaiah N.** Assessment of Antioxidant Activities of Eugenol by in vitro and in vivo Methods. *Methods Mol Biol.* 2010; 610: 165–180.
- Oğuztürk H, Çiftçi O, Aydın M, Timurkaan N, Beytur A, Yılmaz F.** Ameliorative effects of curcumin against acute cadmium toxicity on male reproductive system in rats. *Andrologia.* 2012; 44: 243-249.
- Ostling O, Johanson KJ.** Microelectrophoretic Study Of Radiation-Induced DNA Damage In Individual Mammalian Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984; 123: 291–298.
- Ömür AD.** Sezon İçi ve Sezon Dışında Koç Spermasının Dondurulmasında Antioksidanların Etkisi. Doktora Tezi, Selçuk Ü. Sağ. Bil. Enst., Konya, 2011.
- Reddy AC, Lokesh BR.** Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 1994; 137(1): 1-8.
- Salamon S, Maxwell WMC.** Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 62(1-3): 77-111.
- Shah SA, H., Andrabi S, MH, Qureshi IZ.** Freezability of water buffalo bull (*Bubalus bubalis*) spermatozoa is improved with the addition of curcumin (diferuoyl methane) in semen extender. *Andrologia.* 2017; 498:1-10.
- Sharma RA, Ireson CR, Verschoyle RD et al.** Effect of dietary curcumin on glutathione S-transferase and malondialdehyde-DNA adducts in rats liver and colon mucosa. *Clin Cancer Res.* 2001; 7: 1452-1458.
- Singh NP, Muller CH, Berger RE.** Effects of Age on DNA Double-Strand Breaks and Apoptosis in Human Sperm. *Fertil. Steril.* 2003; 80(6): 1420-1430.
- Türk G, Şimşek ÜG, Çeribaşı AO, Çeribaşı S, Kaya SÖ, Güvenç M, Çiftçi M, Sönmez M, Yüce A, Bayrakdar A, Yaman M, Tonbak F.** Effect of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) bark oil on heat stress-induced changes in sperm production, testicular lipid peroxidation, testicular apoptosis, and androgenic receptor density in developing Japanese quails. *Theriogenology.* 2015; 84: 365–376.
- Tvrđá E, Tušimová E, Kováčik A, Paál D, Greifová H, Abdramanov A, Lukáč N.** Curcumin has protective and antioxidant properties on bull spermatozoa subjected to induced oxidative stress. *Animal Reproduction Science.* 2016; 172:10-20.
- Watson PF.** Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Veterinary Record.* 1975; 97(1): 12-15.
- Yıldız S, Daşkın A.** Koç spermasının farklı antioksidanlar içeren sulandırıcılarla kısa süreli saklanması. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2004; 10: 155-159.

Effects of Usage of Sepiolite in Layer Diet on Pellet Quality and Pellet Production Parameters

Sakine YALÇIN^{1*}, Sadık ÇIVRACI², Ender BURÇAK³, İlyas ONBAŞILAR⁴

¹*Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University, Ankara.*

²*Demirözü Vocational School, Bayburt University, Bayburt.*

³*Ministry of Food, Agriculture and Livestock, 06800 Ankara, Turkey*

⁴*Laboratory Animal Husbandry and Research Unit, Faculty of Medicine, Hacettepe University, Ankara.*

*Corresponding author e-mail: sayalcin@ankara.edu.tr

ABSTRACT

The purpose of this experiment was to determine the effects of sepiolite usage on pellet quality and pellet production parameters for layer diet under industrial conditions. In this study; 14 t pellet diets for control and treatment groups with 7 batch were produced in a commercial feed factory. Each batch was 2 t. Control group diet manufactured in this study, contained 14.12% crude protein, 4.47% crude fibre and 3.20% ether extract. For the treatment group diet 1% sepiolite was used as top dressed in the mixer. Pelleting disc having 6 mm hole diameter was used in the factory. Sepiolite usage reduced energy consumption at the level of 16.14% and increased pellet durability index significantly ($p<0.001$). Pellet durability index was found to be 49.08% in the control group and 87.39% in the treatment group. Therefore, it is concluded that sepiolite usage in layer diets would be beneficial for improvement in pellet quality.

Keywords: Layer diets, Pellet durability, Pellet quality, Sepiolite.

Yumurta Tavuğu Yemlerinde Sepiyolit Kullanımının Pelet Kalitesi ve Pelet Üretim Parametrelerine Etkisi

ÖZ

Bu araştırmanın amacı, endüstri koşulları altında yumurta tavuğu yemlerinde sepiyolit kullanımının pelet kalitesine ve pelet üretim parametrelerine olan etkisini belirlemektir. Araştırmada, kontrol ve deneme grubu için yedişer parti olmak üzere her grup için toplam 14 tonluk pelet yem ticari bir yem fabrikasında üretilmiştir. Her parti 2 tondur. Üretilen kontrol grubu yemi %14,12 ham protein, %4,47 ham selüloz ve %3,20 ham yağ içermektedir. Deneme grubu yemine karıştırıcıda %1 sepiyolit ilave edilmiştir (top-dressed). Fabrikada 6 mm delik çaplı peletleme diski kullanılmıştır. Sepiyolit kullanımı enerji tüketimini %16,14 düzeyinde azaltmış, pelet dayanıklılık indeksini önemli ölçüde artırmıştır ($p<0,001$). Pelet dayanıklılık indeksi, kontrol grubu yeminde %49,08 ve deneme grubu yeminde %87,39 bulunmuştur. Bu nedenle, yumurta tavuğu yemlerinde sepiyolit kullanımının pelet kalitesi üzerine faydalı etkileri olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Yumurta tavuğu yemi, Pelet dayanıklılığı, Pelet kalitesi, Sepiyolit.

INTRODUCTION

One of the most common heat treatment methods in poultry feed production is pelleting of feeds. The main aim of pelleting is to aggregate the smaller feed particles by the use of heat, mechanical pressure and moisture. Especially, offering feed to the swine and poultry industries in pellet form enhances the economics of production by increasing the feed intake, and thus growth performance and feed efficiency (Patterson 1989, Abdollahi et al. 2013). Löwe (2005) indicated that pellet quality has an economic value because the feed is too expensive to waste. Pellet quality depends proportionally on the factors of 40% feed formulation, 20% feed particle size, 20% steam-conditioning, 15% pellet die specification and 5% cooling and drying. To manufacture high physical quality pellet feed, a number of these factors can be applied alone or in combination (Moritz and Lilly 2010, Abdollahi 2011).

Some researchers (Kertz et al. 1981, Brewer et al. 1989, Zatari et al. 1990, Mina-Boac et al. 2006) stated that good quality pellets have better performance and feed efficiency than those fed with mash, reground pellet feeds and pellet feeds having more fine particles. It was highlighted in recent years the absorptive and rheological properties of clay minerals may be contributed to improving the pellet quality (Galan 1996, Zhang et al. 2017). For this purpose, sepiolite is a good technological additive due to its properties such as reducing energy cost in pellet production, the amount of dusting during the production and transport of feeds (Angulo et al. 1995). EFSA (2013) also reported that sepiolite is a feed additive (E-562) that can be used as a binder and anticaking agent up to 2% in all feeds for all animal species. Since sepiolite binds the other ingredients in the feed, it forms pellets with high durability and hardness.

Latshaw and Moritz (2009) reported that the energy from each unit of feed and heat increment was influenced by the forms of feed. Poultry fed pellet diets spend less time for eating and obtain more nutrients per every unit of expended energy than poultry fed mash diets (Jones et al. 1995, Vilarino et al. 1996). In addition, pellet durability is an important factor affecting production parameters of pelleted feeds.

Sepiolite supplementation at 1% to the broiler diets (Durna et al. 2016), micronized clinoptilolite supplementation at 0.4, 0.6 and 0.8%

(Küçükersan et al. 2016) reduced pellet production time and improved the pellet durability index. Yalçın et al. (2017) reported that 1% sepiolite addition to dairy cattle and fattening cattle concentrates decreased energy consumption during pellet production and enhanced pellet durability index. Angulo et al. (1995) indicated that addition of sepiolite supplementation may improve the performance of pelleted diets, especially those containing high levels of fat. There are limited studies about supplementation of sepiolite in poultry diets for energy consumption during pelleting processes and pellet quality. Therefore the aim of this experiment was to evaluate the effects of sepiolite usage to the diets of laying hens on some pellet production parameters and pellet quality characteristics.

MATERIALS and METHODS

Commercial concentrate feed for laying hen was used in this experiment. Manufacturing pellet feeds were produced in a commercial feed factory. Commercial pellet feed contained mainly corn (582 kg/t), sunflower seed meal (184 kg/t) and soyabean meal (65 kg/t). One control and one treatment group concentrate feeds were manufactured. Sepiolite (Exal T, Manufacturing Lot number: L-12113, Tolsa Turkey) was added to the treatment concentrate feed at 1% as top dressed to the mixer. Generally 1% sepiolite usage is accepted in the commercial feed factories. Sepiolite Exal T used in this experiment was produced in Türkiye-Polatlı (Tolsa Turkey Company). Moisture and ash content of sepiolite were determined according to the AOAC (2000). Mineralogical composition was analysed by D8 Advance Diffractometer AXS (Bruker, Germany). Pellet concentrate feeds were produced with 7 batch (each batch was 2 t) and pellet diameter was 6 mm. Water was not used in the pellet manufacturing processes. The parameters for manufacturing processes are shown in Table 1.

Table 1. Parameters for pellet manufacturing processes

Parameter	Control	Sepiolite
Production, t	14	14
Mixer capacity, t	2	2
Water added in mixer	No	No
Disc hole diameter, mm	6	6
Disc hole length, mm	60	60

In the commercial factory, the data of steam temperature ($^{\circ}\text{C}$), electric current (ampere) and pellet production time (min/10 t) were measured. Energy consumption of pelleting machine (electric power in kilowatts, kW) was calculated as multiplying electric current (in ampere) with voltage supply (volts) and then dividing by 1000. The voltage supply of feed pellet machine was 380 volts.

Seven samples for each group were collected from the mixer, after the conditioner and pelleted

feed after cooling. Moisture content was analysed in all of the samples collected (AOAC, 2000). Crude protein, crude fibre, ether extract, ash and starch analysis of control pelleted feeds were determined (AOAC 2000). The metabolizable energy level was calculated according to the formula proposed by Carpenter and Clegg (1956). Pellet durability index (PDI) was measured with a Pfast Box Equipment (Figure 1) using the sieve having the hole diameter of 4.75 mm (Başer and Yalçın 2017). Quadruplicate measurements were done with each sample.



Figure 1. Pfast box equipment

Statistical Analysis

Data were given as mean \pm standard error of mean. The experimental unit was 7. The normality of data distribution was checked using the Kolmogorov-Smirnov test. Comparison between groups was examined with independent samples t test. Level of significance was taken as $p < 0.05$ (Dawson and Trapp 2001).

RESULTS

Moisture content was found to be 8.20% and ash was 89.80% in sepiolite used in this study. Sepiolite (Exal T) contains 74% sepiolite, 18% dolomite and 8% calcite. The nutrient composition of layer diet for control group was shown in Table 2. The layer diet used in this

study had 36.41% starch and was low in fat (3.20%). Production parameters during pelleting of layer diets were given in Table 3. Addition of 1% sepiolite to the mixer as top dressed significantly ($p < 0.001$) increased steam temperature and reduced energy consumption. Pellet production time was found to be similar for control and treatment group diets. No differences were observed in moisture content of feed samples from the mixer, after conditioner and pellet after cooling between groups (Table 4). Sepiolite addition to layer diet significantly ($p < 0.001$) increased pellet durability index values (Table 5).

Table 2. Nutrient composition of layer diet

Content	%
Dry matter, %	88.31
Crude protein, %	14.12
Crude fibre, %	4.47
Ether extract,%	3.20
Starch, %	36.41
Ash, %	14.34
ME, kcal/kg	2599

Table 3. Production parameters of pelleting of layer feed

Group	Steam temperature, °C	Electric current, Ampere	Energy consumption*, kW	Production time, min/10 t
Control	29.94±0.38	202.81±1.05	77.07±0.40	96
Sepiolite	40.94±0.28	170.08±0.67	64.63±0.26	97
p	<0.001	<0.001	<0.001	

*: Energy consumption was calculated using 380 of voltage in pelleting machine.

Table 4. Moisture (%) content of layer diets during pellet manufacturing

Group	Moisture (%)		
	Mixer	After conditioner	Pellet after cooling
Control	12.18±0.14	14.72±0.10	12.27±0.10
Sepiolite	12.34±0.12	13.84±0.08	12.15±0.08
p	0.155	0.180	0.521

Table 5. Effects of sepiolite addition on PDI (%) value of layer diets

Group	PDI (%)
Control	49.08±0.98
Sepiolite	87.39±0.37
p	<0.001

DISCUSSION

In the factory feeding rate, amount of production, disc hole diameter and disc hole length were same in the manufacturing of pellet concentrate feeds. Production output, energy consumption and pellet quality are important process variables that related to each other. Many factors affect pellet durability and specific energy consumption (Yalçın et al. 2017).

Sepiolite supplementation at the rate of 1% to the mixer as top dressed significantly ($p < 0.01$) reduced energy consumption at the level of 16.14% with increasing steam temperature at the level of 36.74%. The steam temperature in control group was seen to be low, this steam temperature is not enough to obtain high-quality pellet. Similarly, Yalçın et al. (2017) reported that energy consumption is 9.63% lower in dairy cattle feed and 5.27% lower in fattening cattle feed during pelleting process than control group ($p < 0.01$). Addition of dietary sepiolite supplementation also reduces the pellet production time by 8.47% for fattening cattle feed production except for that dairy cattle feed (Yalçın et al. 2017). Durna et al. (2016) observed that 1% sepiolite supplementation reduced pelleting production time at the level of 10.60% in broiler starter diets. Contrarily, in our study, use of sepiolite in layer diets did not affect pellet production time. This case may be due to the ingredients and chemical composition of layer diet. In a conventional pelleting process, increasing conditioning temperature can be performed by increasing steam flow rate. More steam means more heat and moisture; the two primary prerequisites needed to improve binding features and thus improved pellet quality (Abdollahi 2011). Skoch et al. (1981) reported that steam conditioning increased pellet production rate by 250 and 275% on account of enhancing pellet durability index and decreased the amount of fines generated and energy consumption. Abdollahi (2011) also indicated that pellet durability and hardness were increased ($p < 0.001$) with steam-conditioning and increasing conditioning temperatures.

Pellet durability index is an important factor that affects the pellet production parameters. Sepiolite acts as a filter and therefore decreases porosity in pelleted feed. In this study, 1% sepiolite addition increased pellet durability index ($p < 0.001$). Pellet durability index in the diet having 1% sepiolite was 78.06% higher than that of control diet. Sepiolite usage was very effective in layer diet manufactured in this study in the conditions of commercial factory.

Zhang et al. (2017) indicated that addition of 1% palygorskite in broiler pellet diets could enhance the hardness and durability index of pellet, and improve the growth performance of broilers. Durna et al. (2016) reported that the addition of 1% sepiolite to the broiler starter diet increased the pellet durability index. In the study of Angulo et al. (1996), sepiolite improved the durability of pellets of starter chicken diets ($p < 0.05$) but not in the finisher diets. The improvement in pellet quality could be due to the absorptive and rheological properties of sepiolite as a clay (Galan 1996, Lin 2007, Yalçın et al. 2017, Zhang et al. 2017)

CONCLUSION

Consequently, 1% sepiolite supplementation to the diets of laying hens decreased energy consumption during pelleting and enhanced pellet durability index. The results of this study indicate that the use of sepiolite brings benefits to impact on reducing energy costs by improving the efficiency of the pelleting process and improving feed durability by minimizing the formation of fine particles. Further studies are needed to investigate the different levels of sepiolite with different diet formulation on laying hens performance and pellet quality.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Tolsa, SA (Madrid, Spain). The authors wish to thank Kuzucu Feed Mill for pellet production.

REFERENCES

- Abdollahi MR.** (2011). Influence of feed processing on the performance, nutrient utilisation and gut development of poultry and feed quality. PhD thesis. Poultry Nutrition Department, Massey University, Palmerston North, New Zealand, 2011.
- Abdollahi MR, Ravindran V, Svihus B.** Pelleting of broiler diets: An overview with emphasis on pellet quality and nutritional value. *Anim Feed Sci Technol.* 2013; 179:1-23.
- Angulo E, Brufau J, Esteve-Garcia E.** Effect of sepiolite on pellet durability in feeds differing in fat and fibre content. *Anim Feed Sci Technol.* 1995; 53:233-241.
- Angulo E, Brufau J, Esteve-Garcia E.** Effect of a sepiolite product on pellet durability in pig diets differing particle size and in broiler starter and finisher diets. *Anim Feed Sci Technol.* 1996; 63:25-34.
- AOAC.** Official methods of analysis, Association of Official Analytical Chemists. AOAC

- International. 17th ed. Maryland. Chapter 4. 2000; pp. 1-41.
- Başer Ö, Yalçın S.** Determination of some quality characteristics in pet foods. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2017; 64:21-24.
- Brewer CE, Ferket PR, Winowiski TS.** The effect of pellet integrity and lignosulfonate on performance of growing toms. Poultry Sci. 1989; 68 (Suppl 1):18.
- Carpenter KJ, Clegg KM.** The metabolizable energy of poultry feedstuffs in relation to their chemical composition. J Sci Food Agr. 1956; 7:45-51
- Dawson B, Trapp RG.** Basic and Clinical Biostatistics. 3rd ed. Lange Medical Books/McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York, USA, 2001.
- Durna Ö, Onbaşlar İ, Yalçın S, Escribano F.** Broiler yeminde sepiyolit kullanımının pelet kalitesi ve üretim parametreleri üzerine etkisi. 1st International Animal Nutrition Congress. September 28th – October 1st 2016. Spice Hotel and Spa. Antalya-Turkey (Poster). 2016.
- EFSA.** Scientific opinion on the safety and efficacy of a preparation of bentonite and sepiolite (Toxfin Dry) as feed additive for all species. EFSA J, 2013; 11:3179.
- Galan E.** Properties and applications of palygorskite-sepiolite clays. Clay Miner. 1996; 31:443-454.
- Jones FT, Anderson KE, Ferket PR.** Effect of extrusion on feed characteristics and broiler chicken performance. J Appl Poult Res. 1995; 4:300-309.
- Kertz AF, Darcy BK, Prewitt LR.** Eating rate of lactating cows fed four physical forms of the same grain ration. J Dairy Sci. 1981; 64:2388-2391.
- Küçükersan S, Yalçın S, Saçaklı P, Güntürkün OB, Gebeş ES, Dilber F, Pirpanahi M.** Süt ineği karma yeminde mikronize klinoptilolit kullanımının pelet kalitesi ve üretim parametreleri üzerine etkisi. 1st International Animal Nutrition Congress. September 28th – October 1st 2016. Spice Hotel and Spa. Antalya-Turkey (Poster). 2016.
- Latshaw JD, Moritz JS.** The partitioning of metabolisable energy by broiler chickens. Poult Sci. 2009; 88: 98–105.
- Löwe R.** Judging pellet stability as part of pellet quality. Feed Technol. 2005; 9:15-19.
- Mina-Boac J, Maghirang RG, Casada ME.** Durability and breakage of feed pellets during repeated elevator handling. ASABE Annual International Meeting. 2006. Portland Convention Center, Portland, Oregon, 9-12 July 2006. Paper no: 066044. 2006.
- Moritz JS, Lilly KGS.** Production strategies and feeding opportunities for pellets of high quality. Proceedings of the 8th Annual Mid-Atlantic Nutrition Conference. University of Maryland, College Park, MD, 2010; pp: 85-90.
- Patterson DC.** A comparison of various feeding systems for finishing pigs. Anim Feed Sci Technol. 1989; 26:252-260.
- Skoch ER, Behnke KC, Deyoe CW, Binder SF.** The effect of steam-conditioning rate on the pelleting process. Anim Feed Sci Technol. 1981; 6:83-90.
- Vilarino M, Picard MJ, Melcion JP, Faure JM.** Behavioural adaptation of laying hens to dilution of diets under mash and pellet form. Br Poult Sci. 1996; 37:895-907.
- Yalçın S, Onbaşlar I, Gebeş ES, Ramay MS, Güntürkün OB.** Effects of sepiolite usage in the manufacturing of pellet concentrate feeds for dairy cattle and fattening cattle on some production parameters and pellet quality characteristics. Lalahan Hay Araşt Enst Derg. 2017; 57:39-43.
- Zatari IM, Ferket PR, Scheideler SE.** Effect of pellet integrity, calcium lignosulfonate and dietary energy on performance of summer-raised broiler chickens. Poultry Sci. 1990; 69 (Suppl 1):198.
- Zhang L, Yan R, Zhang R, Wen C, Zhou Y.** Effect of different levels of palygorskite inclusion on pellet quality, growth performance and nutrient utilization in broilers. Anim Feed Sci Technol. 2017; 223:73-81.

Gentamisin Verilen Sıçanlara Bor Uygulamasının Hematolojik Parametre Düzeylerine Etkileri[#]

İbrahim DURMUŞ¹, Sinan İNCE², Mehmet Naci SALİM³,
Abdullah ERYAVUZ^{4*}, İsmail KÜÇÜKKURT⁵

¹Afyon Kocatepe Üniversitesi, Şubut MYO, Laborant ve Veteriner Sağlık, Afyonkarabhisar.

²Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji AD, Afyonkarabhisar.

³Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Araştırma ve Uygulama Çiftliği, Afyonkarabhisar.

⁴Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji AD, Afyonkarabhisar.

⁵Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya AD, Afyonkarabhisar.

[#]Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi B.A.P. Koordinasyon Birimi tarafından (proje kodu: 15.VF.08) desteklenmiştir.

*Corresponding author e-mail: erylavuz@aku.edu.tr

ÖZ

Çalışma, gentamisin yan etkilerinden korunmak için bor (B) kullanımının hematolojik parametrelere etkilerini belirlemek amacıyla yapıldı. Toplamda 56 adet Wistar Albino erkek sıçan her grupta 7 hayvan olacak şekilde 8 gruba rastgele ayrıldı. İlk grup kontrol grubu olarak ayrılırken (borsuz yemle beslendiler), deneme grupları ise, gentamisin (100 mg/kg i.p.), B-5 (5 mg/kg B, i.p.), B-10 (10 mg/kg B, i.p.), B-20 (20 mg/kg B, i.p.), B-5 + gentamisin (5 mg/kg B ve 100 mg/kg gentamisin, i.p.), B-10 + gentamisin (10 mg/kg B ve 100 mg/kg gentamisin, i.p.), B-20 + gentamisin (20 mg/kg B ve 100 mg/kg gentamisin, i.p.) şeklinde oluşturuldu. Toplam 14 gün süren deneme döneminde, sıçanlara gentamisin enjeksiyonundan 4 gün önce B verilmeye başlandı ve denemenin 14.gününde tamamlandı. Gentamisin uygulamasına 4. gün başlandı ve deneme döneminin 12. gününde bu uygulama sonlandırıldı. Denemenin sonunda, hayvanlardan kan örnekleri anestezi altında kalpten alındı. Alınan kan örneklerinde; eritrosit, lökosit ve trombosit sayıları ile hematokrit değer, hemogloblin miktarı, ortalama eritrosit hacmi (MCV), ortalama eritrosit hemogloblini (MCH) ve ortalama eritrosit hemogloblin düzeyi (MCHC) belirlendi. Gentamisin lökosit sayısını ve hematokrit değeri düşürdü. Yüksek B uygulaması (20 mgB/kg) lökosit sayısını önemli düzeyde azalttı. Sonuç olarak, bor uygulamasının gentamisin yol açtığı lökosit sayısındaki azalmayı önlemede etkiye sahip olmadığı kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Bor, Gentamisin, Lökosit, Eritrosit, Trombosit, Hemogloblin.

Effects of Boron Administration on Hematological Parameters in Rats Given Gentamicin

ABSTRACT

The purpose of this study is to determine the effects of boron (B) utilisation on hematological parameters in order to protect from gentamicin side effects. Totally 56 Wistar Albinomale rats were randomly divided into eight groups containing 7 animal per group. While first group served as a control (fed a diet without boron), experimental groups were as follows; gentamicin group (100 mg/kg, i.p.), B-5 group (5 mg/kg B, i.p.), B-10 group (10 mg/kg B, i.p.), B-20 group (20 mg/kg B, i.p.), B-5 + gentamicin group (5 mg/kg B and 100 mg/kg gentamicin, i.p.), B-10 + gentamicin group (10 mg/kg B and 100 mg/kg gentamicin, i.p.), and B-20 + gentamicin group (20 mg/kg B and 100 mg/kg gentamicin, i.p.). In experimental period lasted totally 14 days, B application started to be given 4 days before injection of gentamicin to rats and was completed the fourteenth day of the experiment. Gentamicin started to be given to rats on the fourth day and finished on the twelfth day of the experiment. In the end of the experiment, the blood samples were taken from the animals by cardiac puncture under anaesthesia. In the blood samples, erythrocyte, leukocyte and platelet counts, haematocrite value, hemoglobin concentration, mean cell volume (MCV), mean cell hemoglobin (MCH), mean cell hemoglobine concentration (MCHC) were determined. Gentamicin decreased leucocyte counts and haematocrite value. High boron utilization (20 mg/kg B, i.p.) decreased significantly leucocyte counts. In conclusion, the boron supplementation has no a preventive effect on leucocyte counts reduced by gentamicin.

Keywords: Boron, Gentamicin, Leukocyte, Erythrocyte, Platelet, Hemoglobin.

To cite this article: Durmuş İ. İnce S. Salim M. N. Eryavuz A. Küçük Kurt İ. Gentamisin Verilen Sıçanlara Bor Uygulamasının Hematolojik Parametre Düzeylerine Etkileri. Kocatepe Vet.J. (2018) 11(2): 140-147.

GİRİŞ

Hem toplam spektrumu genişleyen hem de sınıflardaki üye sayıları artıp giderek daha yüksek sayılara ulaşan antibiyotiklerin hastalıkların tedavisindeki önemleri tartışılmazdır. Bununla birlikte, tedavide esas olarak beklenen etki için kullanılan antibiyotiklerin istenmeyen, beklenmeyen, ters veya yan etkileri de bulunmaktadır. Organizmanın normal fizyolojik fonksiyonlarını ilgilendiren yan etkiler geniş bir alana yayılmış durumdadır. Aminoglikozid ilaçlar içinde amikasinin sonra, spektrumu en geniş ve antibakteriyel etki gücü en yüksek olan gentamisin yol açtığı nefrotoksik etki de uzun zamandır bilinmekte (Conzelman, 1980) ve bu etkinin oluşmasında ilacın dozu ve kullanım süresinin de önemli olduğu bildirilmektedir (Lopez-Novoa ve ark., 2011). Nitekim 7 günden fazla gentamisin kullanan hastaların % 30'unda akut böbrek bozukluğu olduğu bildirilmektedir. (Pedraza-Chaverri ve ark. 2000)

Gentamisinin neden olduğu nefrotoksitede, vücutta oluşan serbest radikallerin etkisi sonucu membran yapısında bulunan doymamış yağ asidi zincirlerinin moleküler oksijenle etkileşimiyle meydana gelen lipid peroksidasyonunun önemli bir rol oynadığı ifade edilmektedir (Kays ve ark. 1991, Pedraza-Chaverri ve ark. 2000, Küçükkurt ve ark. 2017). Nitekim Ertekin ve ark. (2003), gentamisin verilen köpeklerde zamana bağlı olarak kanda antioksidan vitamin E düzeyinin azaldığı ve lipid peroksidasyonunun en önemli ürünü malondialdehit (MDA) düzeyinin ise arttığını gözlemişlerdir. Son yıllarda, gentamisinin yol açtığı oksidatif strese karşı antioksidan maddelerin kullanılmasının koruyucu etkilerine yönelik çalışmalar yapılmakta ve stratejiler geliştirilmektedir. Bu amaca yönelik daha önce yapılan bazı çalışmalarda, gentamisin ile birlikte antioksidan ajanların ve serbest radikal yakalayıcılarının verilmesinin, gentamisine bağlı yan etkileri kısmen azalttığı veya önlediği gösterilmiştir (Ali ve Bashir 1996, Abdel-Naim ve ark. 1999, Pedraza-Chaverri ve ark. 2000, Ozbek ve ark. 2000, Sayed-Ahmed ve Nagi, 2007, Anandan ve Subramanian, 2012, Küçükkurt ve ark. 2017). Bu bilgi, hastalıkların tedavileri süresince kullanılan gentamisin kaynaklanabilecek olan oksidatif stres tehdidine karşı bu antibiyotiğe ek olarak hem koruyucu hem de tedavi amaçlı olarak antioksidan uygulamalarının yararlı olabileceğini göstermektedir. Nitekim Anandan ve Subramanian (2012), bir narenciye flavanoidi olan ve antioksidan etkiye sahip hesperidin, serbest radikal süpürücü etkisiyle sıçanlarda gentamisinin neden olduğu nefrotoksik etkileri azalttığını bulmuşlardır.

İnsan ve hayvanlarda esansiyel bir besin olduğu belirlenmiş (Devirian ve Volpe, 2003, Farfan-Garcia ve ark. 2016) iz minerallerden biri olan ve ülkemizde bol miktarda bulunan bor mineralinin de antioksidan etkilere sahip olduğu (İnce ve ark. 2010) ve gentamisinin neden olduğu oksidatif stresi azalttığı (Küçükkurt ve ark. 2017) gösterilmiştir. Biyolojik sahada bor mineralinin kullanılma düzeyine bağlı olarak terapötik ya da toksik etkiler gösterebilmesi nedeniyle insan ve hayvanlarda günlük alınması gerekli miktarının ne olduğuna yönelik bir öneri hala bulunmamaktadır (Pahl ve ark. 2005, Farfan-Garcia ve ark. 2016). Bu yüzden, insan ve hayvanlarda çeşitli besinsel, metabolik ve fizyolojik koşullarda bor mineralinin kaynak ve düzeyinin biyolojik önemini belirlemeye yönelik çalışmalar hala devam etmektedir. Bu çalışmalardan bazılarında da (Farfan-Garcia ve ark. 2016) bilinen bazı ilaçların borla birlikte kullanılmasının, bu ilaçların ilgi ve duyarlılıklarını artırdığı ifade edilmektedir. Nitekim bazı tıbbi bileşiklere bor ilave edildiğinde, bu bileşiklerin etkinliğinde gelişmeler sağlanmıştır (Lesnikovski, 2016). Son yapılan bir araştırmada (Cakir ve ark. 2017), deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda bor uygulamasının kan glikoz düzeyini düşürdüğü ve bazı biyokimyasal parametrelerde yararlı etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bor ilave edilen yemlerle beslenen hayvanlarda hematolojik değerlerde de değişimler gözlenmektedir. Protein kısıtlaması yapılmış ve bor ilave edilmiş yemle beslenen ördeklerde, kan hemoglobin düzeyi ve hematokrit değerinin azaldığı bildirilmektedir (Hoffman ve ark. 1991). Buna karşın, deneysel bor toksisitesi oluşturulmuş keçilerde ise hemoglobin düzeyinin arttığı bulunmuştur (Sisk ve ark. 1990).

Gentamisin uygulamalarının deney hayvanlarında bazı hematolojik değerlerin düzeylerinde de değişiklikler oluşturduğu yönünde bildirimler bulunmaktadır. Gentamisin verilen köpeklerde, lökosit sayısının yükseldiği, buna karşın eritrosit sayısı ile hematokrit düzeyinin değişmediği bulunmuştur (Ertekin ve ark. 2003). Bununla birlikte, gentamisin uygulamasının kanda lökosit sayısını azalttığına yönelik bildirimler de bulunmaktadır (Sweetman, 2009, Bustos ve ark. 2016). Oksidatif stresin artmasına yol açan şartlarda eritrosit zar dayanıklılığında azalmanın gözlemlendiği (Saha ve ark. 2011) ve antioksidanlarla kuvvetlendirmenin eritrosit zar dayanıksızlığını yenmede etkili oldukları (Vani ve ark. 2010) bildirilmektedir.

Hematolojik parametreler, gerek hastalık ve metabolik bozuklukların tespit edilmesi gerekse ilaçların yan etkilerinin izlenmesinde rutin olarak ölçülmekte ve bu sayede fizyolojik olaylarda rol

oynayan mekanizmalarda oluşan değişimler açıklanabilmektedir. Diyetle veya gıda takviyesi olarak alınan borun %84-85'inin idrar ile vücuttan atıldığı ve plazma bor miktarının başlıca renal atılım ile kontrol altında tutulduğu (Kuru ve Yarat, 2017), kronik bor tüketilmesinin ise böbreklerde toksik etkiler doğurabileceği (Pahl ve ark. 2005) bildirimleri dikkate alınır, nefrotoksik etkilere sahip gentamisinle birlikte bor uygulamasının hematolojik parametrelere olası etkilerinin ortaya konması önemli olmaktadır. Bu nedenle bu çalışma, gentamisinin oluşturduğu yan etkilerin azaltılması amacıyla antioksidan özelliğinden yararlanmak için değişik düzeylerde i.p. olarak verilen bor mineralinin sıçanların kanında oluşturduğu hematolojik değerlere olan etkilerinin ortaya konması amacıyla yapıldı.

MATERYAL ve METOT

Çalışmada hayvan materyalini AKÜ Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilen 10-12 haftalık yaşta, 56 adet Wistar Albino erkek sıçan (yaklaşık 150-200 g) oluşturdu. Çalışma boyunca hayvanlara yapılacak tüm müdahaleler Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından bildirilen kurallar doğrultusunda 21.05.2015 tarihli ve 59 sayılı etik kurul onayı ile gerçekleştirildi. Hayvanların bakımı Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde gerçekleştirildi. Çalışmada gentamisin toksikasyonu oluşturmak amacıyla gentamisin sülfat (Sigma, MO, USA) kullanıldı. Tedavi gruplarına uygulanacak B kaynağı olarak daha önceki çalışmalarda antioksidan özelliği gösterilen (Ince ve ark. 2010; 2014) borik asit (Sigma, MO, USA) kullanıldı. Ayrıca deneysel çalışma boyunca tüm hayvanlara özel olarak hazırlanan (Bourgeois ve ark. 2007) ve B içermeyen diyet verildi (Tablo 1).

Tablo 1: Çalışmada kullanılan sıçanlara verilen yemin içeriği

Table 1: The composition of basal diet given to rats in the study

İçindekiler	Miktar (g/kg)
Asitle yıkanmış mısır ¹	743.4
Vitaminden yoksun kazein ²	140
İz mineral karışımı ³	10
Makromineral karışımı ⁴	25.4
Vitamin karışımı ⁵	4
Mısır yağı ⁶	75
DL-alfa tokoferol ⁷	0.2
Kolin bitartarat ⁸	2

¹Asitle yıkanmış mısır; mısırlar (kg) 2,8 L 2 N HCl ile 30 dk yıkanarak, üstteki kısım atıldı. Sonrasında 1,2 L deiyonize Su ile 3 kez yıkandı, yıkama sonrası 75 °C de 48 saat kurutulmasıyla diyeteye ilave için hazır hale getirildi.

² Kazein

³İz mineral karışımı (g/kg): asitle yıkanmış mısır, 8.497; NaCl, 1,3000; (CH₃COO)₂Mn·4H₂O, 0,0450; Zn(CH₃COO)₂·2H₂O, 0,0340; demir silgi, 22 çaplı, 0,0350; CuSO₄·5H₂O, 0,0240; Na₂O₃Si·9H₂O, 0,0510; Na₂HAsO₄·7H₂O, 0,0050; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 0,0003; (CH₃CO₂)₇Cr₃(OH)₂, 0,0020; NiCl₂, 0,0020; NaF, 0,0020;

KI, 0,0002; Na₂SeO₃·5H₂O, 0,0005; NH₄VO₃, 0,0003; 3,5 g demir tozu (26 mL çift distile suda hazırlanan 6 mol/L HCl ile çözdürüldü).

⁴ Makromineral karışımı (g/kg): (CH₃COO)₂Mg·4H₂O, 4,4; KCl, 4,0; CaHPO₄, 17,0.

⁵ Vitamin karışımı (g/kg): D-dekstroz, 3,7855; inositol, 0,050; nikotinik asit, 0,030; D-pantotenik asit, 0,016;

riboflavin, 0,027; tiamin-HCl, 0,010; piridoksin-HCl, 0,015; vitamin B₁₂ (% 0,1'lik mannitoldeki çözeltisi), 0,050; 1-5 dihidroksikolekalsiferol (400,000 IU/g), 0,0025; para-aminobenzoik asit, 0,005; retinil palmitat (500,000 IU/g), 0,005; folik asit, 0,002; D-biotin, 0,001; menadion, 0,001.

⁶ Mısır yağı

⁷ DL-alfa tokoferol

⁸ Kolin bitartarat (Bourgeois ve ark., 2007)

Deneysel aşaması toplam 14 gün süren çalışmada, hayvanlar rastgele örnekleme metodu ile her grupta

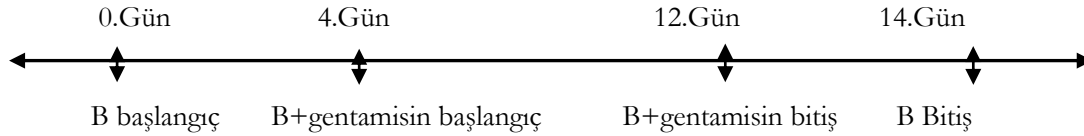
7 sıçan olacak şekilde 8 gruba ayrıldı ve çalışmadaki gruplara uygulanan yöntem Tablo 2 verildi.

Tablo 2. Gruplar, gruptaki hayvan sayıları ve uygulama yöntemi
Table 2. Groups, numbers of animals in groups and the application method

Gruplar	Gruptaki hayvan sayısı	Uygulama yöntemi
Grup I	7	Kontrol
Grup II	7	100 mg/kg Gentamisin sülfat, i.p.
Grup III	7	5 mg/kg B, i.p.
Grup IV	7	10 mg/kg B, i.p.
Grup V	7	20 mg/kg B, i.p.
Grup VI	7	5 mg/kg B + 100 mg/kg gentamisin sülfat, i.p.
Grup VII	7	10 mg/kg B + 100 mg/kg gentamisin sülfat, i.p.
Grup VIII	7	20 mg/kg B + 100 mg/kg gentamisin sülfat, i.p.

Bor kaynağı olarak serum fizyolojik içinde çözdürülerek hazırlanan borik asit 5, 10 ve 20 mgB/kg dozlarda periton içi (i.p.) yolla (Ince ve ark., 2014) 3., 4. ve 5. gruplarda bulunan sıçanlara 14 gün süreyle ve borik asit 5, 10 ve 20 mgB/kg dozlarda periton içi(i.p.) yolla 6., 7. ve 8. gruptaki sıçanlara gentamisin enjeksiyonundan 4 gün önce vermeye başlandı ve gentamisin uygulamasının bitişinden itibaren 2 gün daha verildi (Tablo

2).Enjeksiyona hazır hale getirilen gentamisin ise 100 mg/kg dozda 2., 6., 7. ve 8.gruplardaki hayvanlara B uygulamasından sonra 4. günde i.p. yolla vermeye başlandı ve 8 gün boyunca günde tek doz halinde uygulandı (Tablo 2). Çalışmanın 14. günü gecesi sıçanlar aç bırakıldı ve 12 saat açlık sonrası ketamin (65 mg/kg, i.p.) - ksilazin (7 mg/kg, i.p.) anestezisi altında deney hayvanlarından analizler için gerekli kan örnekleri alındı.



Alınan kan örneklerinin Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan kan sayım cihazında (Mindray BC2800 VET, Çin) ölçümleri yapılarak; lökosit (WBC), eritrosit (RBC) ve trombosit (PLT) sayıları, hemogloblin (Hb) miktarı, hemotokrit (Hct) değer ile ortalama eritrosit hacmi (MCV), ortalama eritrosit hemoglobini (MCH) ve ortalama eritrosit hemoglobin düzeyi (MCHC) değerleri belirlendi.

Araştırmadan elde edilen sonuçlar, SPSS 20,0 istatistik paket programında tek yönlü ANOVA testi uygulanarak yapıldı. İstatistiksel fark bulunan sonuçlara Duncan testi uygulandı, veriler "ortalama ± standart sapma" olarak ifade edildi. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmada tüm gruplarda elde edilen RBC, WBC, Hb, Hct, % lenfosit, % monosit, % granulasit, MCV, MCH, MCHC ve PLT'e yönelik veriler Tablo 3'de verilmiştir. Çalışmada gentamisin uygulamasının sıçanlarda lökosit sayısı ve Hct değeri istatistiksel açıdan önemli ($p < 0.05$) düzeyde düşürdüğü ancak diğer incelenen parametrelere etkisinin olmadığı bulundu (Tablo 3). Değişik düzeyde B uygulamasının ise sadece 20 mg/kg düzeyinde B uygulamasının lökosit sayısını istatistiksel anlamda önemli ($p < 0.05$) düzeyde düşürdüğü ancak diğer düşük B düzeylerinin incelenen parametrelere etkilerinin olmadığı tespit edildi (Tablo 3). Gentamisinin neden olduğu lökosit sayısındaki azalmayı, gentamisin verilen hayvanlara uygulanan bor düzeylerinden hiç birinin düzeltmediği gözlenirken, Hct düzeyindeki azalmanın B uygulamaları ile önlenmediği saptandı.

Tablo 3. Erkek sıçanlarda 100 mg/kg dozunda gentamisin (Gen), 5, 10 ve 20 mgB/kg düzeylerindeki borun B) ve 100 mg/kg Gen +5 (B-5), 10 (B-10) ve 20 (B-20) mg/kg miktarlarında bor uygulamasının kan parametrelerine etkisi

Table 3. The effects of gentamicin at dose 100 mg/kg, boron at levels of 5, 10 and 20 mgB/kg and gentamicin (100 mg/kg) plus boron (5, 10 and 20 mgB/kg) on hematological parameters in male rats

	KONTROL	Gen	B- 5	B-10	B-20	B-5+Gen	B-10+Gen	B-20+Gen
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	9.44 \pm 2.41 ^a	5.11 \pm 1.94 ^b	9.05 \pm 3.81 ^a	3.11 \pm 3.03 ^{ab}	8.00 \pm 2.21 ^b	5.67 \pm 1.44 ^b	5.72 \pm 2.95 ^b	6.55 \pm 1.06 ^b
LENF%	75.48 \pm 6.74	77.31 \pm 8.41	77.75 \pm 4.13	75.48 \pm 5.36	75.65 \pm 4.52	78.71 \pm 4.49	75.70 \pm 9.74	71.03 \pm 8.02
MON%	3.64 \pm 0.90	4.32 \pm 0.92	3.71 \pm 2.72	3.91 \pm 0.34	3.95 \pm 2.09	4.20 \pm 0.79	3.91 \pm 0.34	3.58 \pm 0.87
GRAN%	20.70 \pm 4.18	29.10 \pm 8.11	21.60 \pm 3.78	24.05 \pm 9.98	24.98 \pm 4.37	21.60 \pm 2.78	22.50 \pm 3.78	23.06 \pm 9.23
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	7.74 \pm 0.51	6.78 \pm 0.73	7.23 \pm 1.03	7.22 \pm 0.72	7.09 \pm 0.76	6.94 \pm 0.59	7.22 \pm 0.70	7.33 \pm 0.35
HGB (g/dl)	13.50 \pm 1.52	15.22 \pm 1.00	13.85 \pm 1.23	13.84 \pm 0.87	13.98 \pm 1.20	14.77 \pm 1.21	14.77 \pm 1.21	14.25 \pm 1.92
HCT (%)	39.52 \pm 2.91 ^a	32.60 \pm 3.11 ^b	38.74 \pm 4.15 ^a	37.47 \pm 3.82 ^a	37.20 \pm 4.22 ^a	38.46 \pm 4.64 ^a	38.60 \pm 3.09 ^a	38.47 \pm 3.52 ^a
MCV (μ^3)	57.60 \pm 1.50	55.68 \pm 0.66	57.20 \pm 1.36	57.52 \pm 1.22	55.42 \pm 2.30	55.60 \pm 4.21	56.52 \pm 1.12	54.41 \pm 1.44
MCH (pg)	19.62 \pm 0.39	19.90 \pm 0.48	20.42 \pm 0.48	20.44 \pm 0.56	19.74 \pm 0.78	19.66 \pm 1.86	20.44 \pm 0.56	19.68 \pm 0.57
MCHC (%)	35.15 \pm 0.36	35.86 \pm 0.87	35.80 \pm 1.33	35.61 \pm 1.10	35.71 \pm 0.96	36.08 \pm 1.41	35.61 \pm 1.10	36.95 \pm 1.29
PLT ($\times 10^5/\mu\text{L}$)	11.32 \pm 1.85	12.11 \pm 3.07	12.48 \pm 2.64	9.66 \pm 4.10	14.04 \pm 3.50	14.60 \pm 1.96	9.66 \pm 4.10	11.17 \pm 3.03

Ortalama \pm standart sapma; n=7

^{a,b,c,d,e}: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). WBC: Lökosit, LINF: lenfosit, MON: monosit, GRAN: granulosit, RBC: Eritrosit, HGB: hemoglobin, HCT: hematokrit, MCV: ortalama eritrosit hacmi, MCH: her bir kırmızı kan hücresindeki ortalama hemoglobin, MCHC: belli bir miktar kırmızı kan hücresindeki hemoglobin yoğunluğu, PLT: trombosit

TARTIŞMA

Tüm canlılarda hematolojik ve biyokimyasal parametrelerdeki değişimler; pek çok klinik ve subklinik hastalıkların ayırıcı tanısı, şiddetinin belirlenmesi, seyrinin takibi ve tedavinin ulaştığı düzeyin tespiti ile vücuttaki metabolik olayları ve organların fonksiyonlarını yansıması bakımından hekimlere ve araştırmacılara önemli bilgiler vermektedir (NseAbasi ve ark. 2014). Ayrıca, hematolojik değerlerde meydana gelen değişimler, sağlıklı yaşamın kontrol programları içerisinde ve çevre ile beslemenin kan yapan organlara etkisinin göstermesinde de başvurulan parametreler arasındadır (Lewis, 1990, NseAbasi ve ark. 2014). Bununla birlikte, değişik hayvan türleri kullanılarak yapılan toksikolojik çalışmalarda da ilaçların yan etkilerini belirlemek ve izlemek için hematolojik parametrelerdeki değişimler incelenmektedir (Başoğlu ve ark. 2010).

Hastalıkların tedavisindeki önemleri nedeniyle antibiyotiklerin ve bunların yan etkilerini azaltmak

ya da yok etmek için kullanılan maddelerin hematolojik değerlerde meydana getirdiği istenmeyen veya beklenmeyen yan etkilerinin tespit edilmesi, ilgili antibiyotiğin ve birlikte kullanılan maddenin tedavide kullanılmasındaki seçenek bakımından değerlendirilmesinde hekimlere ve araştırmacılara önemli bilgiler sunacaktır. Bu çalışmada; aminoglikozid yapılı bir antibiyotik olan gentamisin yüksek dozda ve uzun süre kullanılmasına bağlı olarak nefrotoksisite gelişmesinin yüksek olduğu bildirimlerinden (Ateşşahin ve ark. 2003, Anandan ve Subramanian, 2012) hareketle sıçanlara 100 mg / kg doz düzeyinde gentamisin 7 gün süreyle uygulanmış ve gentamisin uygulaması ile antioksidan özelliğe sahip bor mineralinin birlikte kullanılmasına bağlı olarak hematolojik değerlerdeki değişimleri ele alınmıştır. Çalışmada kullanılan borik asit düzeyleri, sıçanlarda üreme ve gelişmede yan etkilerin gözlenmediği bildirilen (Farfan-Garcia ve ark. 2016) düzeyler (sırasıyla 9.6mgB/kg/gün ve 17.5mgB/kg/gün) dikkate alınarak 5, 10 ve 20 mg/kg olarak belirlendi.

Yangısal reaksiyonların anahtar özelliklerinden biri de, doku hasarının olduğu bölgeye lökosit takviyesinin yapılmasıdır. Bazı antibiyotiklerin serbest radikal üretimini artırarak lökositler (Páez ve ark., 2008) ve tüm kanda (Correa-salde ve Albesa, 2009) olumsuz etkiler gösterdiği, gentamisin de benzer şekilde etkiler göstererek lökopeniye yol açtığı (Sweetman, 2009) ifade edilmektedir. Nitekim Bustos ve ark. (2016), in vitro insan lökositlerinde gentamisin serbest radikal üretimini artırdığını göstermişlerdir. Bu çalışmada, gentamisin uygulamasına bağlı olarak kan lökosit sayısındaki azalmanın araştırmacıların (Bustos ve ark., 2016) bulgularını desteklediği gözlemlendi. Bununla birlikte, çalışmada elde edilen bu bulgu, köpeklerde gentamisin uygulaması öncesine göre uygulamanın 5. gününden 10.gününe kadar kanda lökosit sayısının arttığı yönündeki bildirimle (Ertekin ve ark., 2003) ters olduğu gözlemlendi. Araştırmacılar (Ertekin ve ark. 2003) lökosit sayısındaki uygulama sonrası 2. günde önemsiz olmasına rağmen 5.günden itibaren meydana gelen artışın, strese bağlı olarak şekillenebileceğini öne sürmüşlerdir. Ertekin ve ark. (2003), köpeklerde nefrotoksikosis oluşturmak amacıyla, her sekiz saatte bir ve günde üç kez olmak üzere toplam 10 gün süreyle 15 mg/Kg dozunda kas içi yolla gentamisin uygulaması yapmışlardır. Bu çalışmada elde edilen bulgular, toksik etki yaptığı bildirilen (Ateşşahin ve ark., 2003) ve sıçanlarda nefrotoksik etkiler oluşturduğu gösterilen (Anandan ve Subramanian, 2012) gentamisin 100 mg / kg doz düzeyinin kullanılmasına bağlı şekillenmiş olabilir. Diğer yandan, tavşanlarda gentamisin uygulamasının lökosit sayısını azalttığı yönündeki bildirimle (Corrigan ve Bell, 1971) uyumlu olarak sunulan çalışmada yüksek düzeyde gentamisin uygulaması kanda lökosit sayısını azaltmıştır. Bununla birlikte, gentamisin uygulanan grupta elde edilen lökosit sayıları, sıçanlarda bildirilen (Kaya ve Çenesiz, 2010) normal sayıların ($3-17 \times 10^3/\text{mm}^3$) arasında olduğu gözlemlendi.

Gentamisin uygulanan sıçanlarda gözlenen lökosit sayısındaki azalma, gentamisin hücre içi oksidatif stres artışına yol açmasından dolayı kaynaklanmış olabilir (Becerra ve ark. 2003, Küçük Kurt ve ark., 2017). Nitekim, reaktif oksijen türlerinin üretimindeki aşırı artışın doku hasarına yol açabileceği ifade edilmektedir (İnce ve ark., 2010). Bu çalışmada, antioksidan özelliğe sahip olduğu gösterilen (İnce ve ark. 2010, Küçük Kurt ve ark., 2017, Cakir ve ark., 2017) bor minerali verilen gruplarda borun uygulama doz miktarı arttıkça, lökosit sayısında azalma olduğu tespit edildi. Bu azalmanın sıçanların gelişmesinde borik asidin yan etki göstermediği ifade edilen (Farfan-Garcia ve ark. 2016) düzeyin (17,5 mg/kg/gün) üzerindeki düzeydeki (20mg/kg) ilavede istatistiksel anlamda

önemli olduğu gözlemlendi (Tablo 3). Nitekim sıçanlarda 15 mg/kg gün bor oral olarak verildiğinde lökosit sayısının etkilenmediği bildirilmektedir (Yıldırım ve ark. 2017).

Gentamisin+bor uygulamasının da gentamisin neden olduğu lökosit sayısındaki azalmaya etkisinin olmadığı bulundu. Bu bulgu, bor mineralinin antioksidan etkisinin lökositleri korumaya yetecek yeterlilikte olmadığı gibi bizzat kendisinin de yüksek dozda kullanılmasının olumsuz etki gösterdiğine işaret etmektedir. Bor mineralinin yüksek dozlarda lökositlere olan olumsuz etkisinin nedenlerini ortaya çıkarabilecek daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Çalışmada, sıçanlara gentamisin ile birlikte bor minerali uygulamasının lökosit yüzde oranlarına etkisinin olmadığı gözlemlendi. Bustos ve ark. (2016), yaptıkları in vitro çalışmalarında gentamisin uygulamasına bağlı serbest radikal üretiminin polinükleer lökositlerde mononükleer lökositlere göre iki kat daha yüksek olduğunu gözlemişler ve başlıca nötrofiller olmak üzere polinükleer lökositlerin mononükleer lökositlere göre gentamisin uygulamasına bağlı olarak daha fazla serbest radikal üretmeye yönelik uyarıldıklarını ileri sürmüşlerdir. Benzer şekilde, makrolid grubu antibiyotiklerin oksidatif patlamada ve apoptoziste değişiklikler oluşturarak nötrofiller üzerinde direkt etki oluşturabildikleri de ifade edilmektedir (Altenburg ve ark. 2011). Bu çalışmada, gerek gentamisin uygulamasının gerekse bor uygulamasının granülositler ile monosit ve lenfosit düzeylerinin yüzde oranlarına istatistiksel önemde bir etkisinin olmadığı bulundu. Bu çalışmada in vivo elde edilen bu bulgular ile araştırmacıların (Bustos ve ark. 2016) in vitro bildirimleri arasındaki farkın deneme metodundan kaynaklanabileceği ileri sürülebilir.

Çalışmada hem gentamisin hem de bor uygulamalarının eritrosit sayısı ve hemoglobin düzeylerine etkisinin olmadığı, gentamisin uygulamasının ise hematokrit düzeyini azalttığı ancak bor ilavesinin bu azalmayı önlediği bulundu. Bu bulgu, protein kısıtlaması yapılmış ve bor ilave edilmiş yemle beslenen ördeklerde, kan hemoglobin düzeyi ve hematokrit değerinin azaldığı bildirimini (Hoffman ve ark. 1991) ile deneysel bor toksisitesi oluşturulmuş keçilerde hemoglobin düzeyinin arttığı yönündeki bildirimle (Sisk ve ark. 1990) farklılık arz etmiştir. Bunun nedeni çalışmalarda kullanılan bor mineralin düzeyi, kaynağı ve denemede kullanılan hayvan türlerinin farklı olmasından kaynaklanabilir (Farfan-Garcia ve ark. 2016). Nitekim lityum bor verilen sıçanlarda (Yıldırım ve ark. 2017) ve boraks verilen tavşanlarda (Başoğlu ve ark. 2010) eritrosit sayısı, hemoglobin miktarı ve hematokrit değer ile

platelet sayısının etkilenmediği bildirilmektedir. Bu çalışmada elde edilen eritrosit sayısı, hemoglobin miktarı, hematokrit değer ile ortalama eritrosit hacmi (MCV), ortalama eritrosit hemoglobini (MCH), ortalama eritrosit hemoglobin düzeyi (MCHC) ve platelet sayısı; sıçanlarda bildirilen (Kaya ve Çenesiz, 2010) normal (sırasıyla 5-10x10⁶/mm³, 11-18 g/dl, %36-57,46-65 fl, 11,9-19,0 pg, 25,9-35,1 g/dl ve 500-1300x10³/mm³) değerlere yakın ya da arasında bulunmuştur.

SONUÇ

Çalışmada; hem gentamisin uygulamasının hem de bor mineralinin bu çalışmada kullanılan yüksek düzeyinin yol açtığı lökosit sayısındaki azalma nedeniyle, vücudun savunmasında önemli fonksiyona sahip lökositlerin işlevlerinde olumsuz etkilerinin olabileceği söylenebilir. Bu nedenle, antibakteriyel ilaç olarak gentamisin tedavide kullanılacağına, sadece bakterilerin duyarlılığı değil aynı zamanda konakçı savunma sistemine olan etkileri de göz önünde tutulmalıdır. Çalışmada bor uygulamasına yönelik elde edilen bulguların, borun insan ve hayvanların hem fizyolojik fonksiyonlarında oluşturduğu etkilerin mekanizmasını açıklamaya hem de günlük diyetle alınması gerekli düzeyinin belirlenmesine katkı sağlayacağı kanaatine varıldı.

KAYNAKÇA

- Abdel-Naim AB, Abdel-Wahab MH, Attia FF.** Protective effects of vitamin E and probucol against gentamicin-induced nephrotoxicity in rat. *Pharmacol. Res.*1999; 40: 183-187.
- Ali BH, Bashir AK.** Effect of superoxide dismutase treatment on gentamicin nephrotoxicity in rats. *Gen. Pharmacol* 1996; 27: 349-353.
- Altenburg J, de Graaf C, van der Werf T, Boersma W.** Immunomodulatory effects of macrolide antibiotics. part 1: biological mechanisms. *Respiration* 2011; 81: 67-74.
- Anandan R, Subramanian P.** Renal protective effect of hesperidin on gentamicin-induced acute nephrotoxicity in male Wistar albino rats. *Redox Report* 2012; 17: 219-226.
- Atessahin A, Karahan I, Yilmaz S, Çeribaşı AO, Princci I.** The effect of manganese chloride on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmac. Res.* 2003; 48: 637-642.
- Basoglu A, Baspınar N, Ozturk AS, Akalin PP.** Effects of boron administration on hepatic steatosis, hematological and biochemical

profiles in obese rats. *Trace Elem. Electrol.* 2010; 27: 225-231.

- Becerra MC, Eraso AJ, Albesa I.** Comparison of oxidative stress induced by ciprofloxacin and pyoverdin in bacteria and in leukocytes to evaluate toxicity. *Lumin* 2003; 18: 334–340.
- Bourgeois AC, Scott ME, Sabally K, Koski KG.** Low dietary boron reduces parasite (nematoda) survival and alters cytokine profiles but the infection modifies liver minerals in mice. *J. Nutr.* 2007; 137: 2080–86.
- Bustos PS, Deza-Ponzio R, Páez PL, Albesa I, Cabrera J, Virgolini MB, Ortega MG.** Protective effect of quercetin in gentamicin-induced oxidative stress in vitro and in vivo in blood cells. Effect on gentamicin antimicrobial activity. *Environ. Tox. Pharm.* 2016; 48: 253-264.
- Cakir S, Eren M, Senturk M, Sarica ZS.** The effect of boron on some biochemical parameters in experimental diabetic rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 2017. <https://doi.org/10.1007/s12011-017-1182-0> Erişim Tarihi: 15.03.2018
- Conzelman GM.** Pathogenesis of Renal Failure due to Aminoglycosides and Contrast Media Used in Roentgenography. *Am. J. Med.* 1980; 69: 767-774.
- Correa-salde V, Albesa I.** Reactive oxidant species and oxidation of protein and hemoglobin as biomarkers of susceptibility to stress caused by chloramphenicol. *Biomed. Pharmacother.* 2009; 63: 100-104.
- Corrigan JJ, Bell BM.** Comparison between the polymyxins and gentamicin in preventing endotoxin-induced intravascular coagulation and leukopenia. *Infect. Immunit.* 1971; 5: 563-566.
- Devirian TA, Volpe SL.** The physiological effects of dietary boron. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2003; 43(2): 219-231.
- Ertekin A, Karaca M, Akkan HA, Cemek M, Ormancı N.** Köpeklerde gentamisin nefrotoksikozisinde lipid peroksidasyonu, antioksidan maddeler, antioksidan vitaminler ve bazı hematolojik-biyokimyasal parametre düzeylerinin araştırılması. *Tr. J. Vet. Anim. Sci.* 2003; 27: 535-540.
- Farfan-Garcia ED, Castillo-Mendieta NT, Ciprés-Flores FJ, Padilla-Martínez II, Trujillo-Ferrara JG, Soriano-Ursúa, MA.** Current data regarding the structure-toxicity relationship of boron-containing

- compounds. *Toxicol. Letters* 2016; 258: 115-125.
- Hoffman DJ, Sanderson CJ, Le Captain LJ, Cromatie E, Pendleton GW.** Interactive effects of boron, selenium, and dietary protein on survival, growth, and physiology in mallard ducklings. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1991; 20: 288-294.
- İnce S, Kucukkurt I, Cigerci IH, Fidan AF, Eryavuz A.** The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2010; 24: 161-164.
- İnce S, Kucukkurt I, Demirel HH, Acaroz DA, Akbel E, Cigerci, IH.** Protective effects of boron on cyclophosphamide induced lipid peroxidation and genotoxicity in rats. *Chemosphere* 2014; 108: 197-204.
- Kaya M, Çenesiz M.** Deney hayvanlarının fizyolojisi. In: Aksoy A, Kolbakır F, Hökelek M editors. *Laboratuvar hayvanları*. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları 2010; p.42.
- Kays SE, Crowell WA, Johnson MA.** Iron supplementation increase gentamicin nephrotoxicity in rats. *J Nutr* 1991; 121: 1869-1875.
- Kuru R, Yarat A.** Bor ve sağlığımıza olan etkilerine güncel bir bakış. *Clin. Exp. Health Sci.* 2017; 7,(3): 107-114.
- Küçükkurt İ, Arslan-Acaröz D, Demirel HH, İnce S, Eryavuz A.** Ratlarda gentamicin ile indüklenmiş oksidatif strese borun muhtemel koruyucu etkisinin dokularda araştırılması. *Kocatepe Vet. J.* 2017; 10: 172-179.
- Lesnikovsk ZJ.** 2016. Recent developments with boron as a platform for novel drug design. *Exp. Opin. Drug Discov.* 2016; 11: 569-578.
- Lewis SM.** Standardization and harmonization of the blood count: the role of International Committee for Standardization in Haematology (ICSH). *Eur J Haematol Suppl.* 1990; 53: 9-13.
- Lopez-Novoa JM, Quiros Y, Vicente L, Morales AI, Lopez-Hernandez FJ.** New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney Int* 2011; 79: 33-45.
- NseAbasi NE, Mary EW, Uduak A, Edem EAO.** Haematological parameters and factors affecting their values. *Agric Sci* 2014; 2: 37-47.
- Ozbek E, Turkoz Y, Sahna E, Ozugurlu F, Mizrak B, Ozbek M.** Melatonin administration prevents the nephrotoxicity induced by gentamicin. *BJU Int.* 2000; 85: 742-746.
- Páez PL, Becerra MC, Albesa I.** Chloramphenicol-induced oxidative stress in human neutrophils. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2008; 103: 349-353.
- Pahl, V.M. Culver, D.B. Vaziri, D.N.** Boron and the kidney. *J. Ren. Nutr.* 2005; 15: 362-370.
- Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Olivares-Corichi IM, Granados-Silvestre MA, Hernandez-Pando R.** Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 29: 602-611.
- Saha S, Ramanathan R, Basu RA, Banerjee D, Chakrabarti A.** Elevated levels of redox regulators, membrane-bound globin chains and cytoskeletal protein fragments in hereditary spherocytosis erythrocyte proteome. *Eur. J. Haematol.* 2011; 87: 259-266.
- Sayed-Ahmed MM, Nagi MN.** Thymoquinone supplementation prevents the development of gentamicin-induced acute renal toxicity in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007; 34: 399-405.
- Sisk DB, Colvin BM, Merrill A, Bondadi K, Bowen JM.** Experimental acute inorganic boron toxicosis in the goat: Effects on serum chemistry and CSF biogenic amines. *Vet. Hum. Toxicol.* 1990; 32: 205-211.
- Sweetman SC. (Ed.)** Martindale the Complete Drug Reference. Pharmaceutical Press 2009; London.
- Vani R, Reddy CS, Asha Devi S.** Oxidative stress in erythrocytes: A study on the effect of antioxidant mixtures during intermittent exposures to high altitude. *Int. J. Biometeorol.* 2010; 54: 553-562.
- Yildirim S, Celikezen FC, Oto G, Sengul E, Bulduk M, Tasdemir M, Cinar DA.** An investigation of protective effects of lithium borate on blood and histopathological parameters in acute cadmium-induced rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 2017; DOI 10.1007/s12011-017-1089-9.

Ramlıç ve Dağlıç Koyunlarda Kırkım Sonu Canlı Ağırlık, Yapağı Verimi ve Özellikleri[#]

Özge BAĞKESEN¹, Serdar KOÇAK²*

¹ Demirci İlçe Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, Manisa

² Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Zootečni Anabilim Dalı, Afyonkarahisar

[#]Bu makale birinci yazarın aynı isimli yüksek lisans tezinden özetlenmiştir

*Corresponding author e-mail: serkocak@aku.edu.tr

ÖZ

Bu çalışma, Ramlıç ve Dağlıç ırkı koyunlarda kırkım sonu canlı ağırlık, kirli yapağı verimi ve bazı yapağı özellikleri ile bunları etkileyen faktörlerin incelenmesi amacıyla yapılmıştır. Araştırmada 296 baş Ramlıç, 232 baş Dağlıç koyun ve yapağıları kullanılmıştır. Bu çalışma yetiştirici elindeki 4 farklı sürüde 2015 yılında yürütülmüştür. Ramlıçlarda kırkım sonu canlı ağırlık, kirli yapağı verimi, lüle uzunluğu, elyaf gerçek uzunluğu ve yapağı randımanı genel ortalamaları sırasıyla; 64,08±0,521kg, 3,07±0,051kg, 5,89±0,068cm, 8,84±0,145cm ve %73,21±0,980 olarak belirlenmiştir. Ramlıçlarda sürünün kirli yapağı verimi, lüle uzunluğu, elyaf gerçek uzunluğu ve yapağı randımanına etkisi önemli (p<0,05; p<0,01; p<0,001), yaşın ise kırkım sonu canlı ağırlık, kirli yapağı verimi ve elyaf gerçek uzunluğuna etkisi önemli (p<0,01; p<0,001) bulunmuştur. Dağlıçlarda kırkım sonu canlı ağırlık, kirli yapağı verimi, lüle uzunluğu, elyaf gerçek uzunluğu ve yapağı randımanı genel ortalamaları sırasıyla; 47,78±0,442kg, 1,63±0,036kg, 9,84±0,149cm, 13,62±0,250cm ve %73,75±0,822 bulunmuştur. Dağlıçlarda sürünün kırkım sonu canlı ağırlık ve lüle uzunluğuna etkisi önemli (p<0,001), yaşın ise kırkım sonu canlı ağırlık, kirli yapağı verimi ve yapağı randımanına etkisi önemli (p<0,05; p<0,01; p<0,001) bulunmuştur. Sonuç olarak kırkım sonu canlı ağırlık bakımından Ramlıç ırkının orta irilikte, Dağlıçların ise küçük yapılı olduğu ve kırkım sonu canlı ağırlık değerlerinin daha önce yapılan çalışmalarda bildirilen değerlerden yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca elyaf gerçek uzunluğu bakımından Ramlıç yapağlarının kumaş yapımında, Dağlıç yapağlarının ise halı sanayinde kullanılabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Koyun, Ramlıç, Dağlıç, Canlı ağırlık, Yapağı özellikleri

Body Weight After Shearing, Greasy Fleece Weight and Some Fleece Traits of Ramlıç and Dağlıç Sheep

ABSTRACT

This research was carried out to investigate the body weights after shearing, greasy fleece weight, some fleece traits and the factors affecting them in Dağlıç and Ramlıç sheep. In this study, 296 Ramlıç and 232 Dağlıç sheep and fleece were used. The research was carried out in four farm operation in 2015, Afyonkarahisar, Turkey. Least squares means for body weights after shearing, greasy fleece weight, staple length, fiber length and clean fleece percentage were determined 64,08±0,521kg, 3,07±0,051kg, 5,89±0,068cm, 8,84±0,145cm and 73,21±0,980 % in Ramlıç. The effect of herd for greasy fleece weight, staple length, fiber length and clean fleece percentage were found statistically significant (p<0,05; p<0,01; p<0,001). The age of affected body weights after shearing, greasy fleece weight and fiber length (p<0,01; p<0,001). The general means for body weights after shearing, greasy fleece weight, staple length, fiber length and clean fleece percentage were determined 47,78±0,442kg, 1,63±0,036kg, 9,84±0,149cm, 13,62±0,250cm and 73,75±0,822 % in Dağlıç. The effect of herd for body weights after shearing and staple length were found statistically significant (p<0,001). The age of affected body weights after shearing, greasy fleece weight and clean fleece percentage (p<0,05; p<0,01; p<0,001). As a result, the medium size of Ramlıç bred for body weights after shearing and Dağlıç in previous studies although was higher than the reported value was made small compared to other native sheep breeds. Furthermore, it has been concluded that Ramlıç fleece in textile and Dağlıç fleece can be used in carpet industry.

Key words: Sheep, Ramlıç, Dağlıç, Body weight, Fleece traits.

GİRİŞ

Hayvancılık sektöründe koyun yetiştiriciliğinin et, süt, yapağı ve deri üretimi bakımından önemli bir yeri vardır. Koyunlardan elde edilen yapağı, tekstil sanayinin temel hammaddelerinden olup ilk kez M.Ö. 4000' lerde Babilliler tarafından kumaş yapımında kullanılmıştır. İnsan yaşamında önemli bir yeri olan yapağı yaygın olarak tekstil ve halı sanayinde değerlendirilmektedir (Kaymakçı 2006). Türkiye İstatistik Kurumunun verilerine göre 2016 yılında yapağı üretiminin % 88,8' i yerli koyun ırklarından karşılanmış ve koyun başına düşen yapağı verimi 1,8 kg olmuştur (Anonim 2017). Türkiye yerli koyun ırklarında yapağı verimi, yapağı ve et-yapağı ırkları ile kıyaslandığında oldukça düşüktür. Türkiye'deki yerli koyunların et ve yapağı verimi ile kalitesinin iyileştirilmesi amacıyla Orta Anadolu Merinosu, Karacabey Merinosu ve Ramlıç ırkları elde edilmiştir. Ramlıç ırkı, 1969 yılında Karacabey Harasından Çifteler Veteriner Zootekni Araştırma Enstitüsüne getirilen Amerika Birleşik Devletleri orijinli Rambouillet ırkı ile Dağlıç koyunlarının melezleme çalışmaları sonucunda geliştirilmiştir. Ramlıçlar, % 65-70 Rambouillet ve % 30-35 Dağlıç genotipi taşımaktadır (Yalçın 1982). Ramlıçlarda yapılan çalışmalarda kırkım sonu canlı ağırlık, kirli yapağı verimi, lüle uzunluğu ve yapağı randımanı sırasıyla; 39,41-46,94 kg; 2,82-3,17 kg; 6,50-8,00 cm ve % 54,00-57,20 olarak bildirilmektedir (Yalçın 1982, Demir 1989a, Demir 1989b, Demir 1995).

Türkiye'nin yerli koyun ırklarından olan Dağlıç'ların, Sakarya Nehri'nden başlayıp Ege bölgesinin kıyı illerine kadar uzanan bölgede özellikle Eskişehir, Afyonkarahisar, Kütahya, Burdur, Uşak, Denizli ve Isparta illerinde yoğun olarak bulunduğu ve Türkiye yerli koyun ırkları içerisinde 1980 yılı verilerine göre 7600000 baş ile üçüncü sırada yer aldığı bildirilmektedir (Yalçın 1982, Akçapınar 1994). Son zamanlarda Dağlıç sayısında hızlı bir azalma meydana gelmiştir. Dağlıçlarda yapılan çalışmalarda kırkım sonu canlı ağırlık, kirli yapağı verimi, lüle uzunluğu ve yapağı randımanı sırasıyla; 30,40-39,72 kg; 1,50-2,68 kg; 12,28-22,71 cm ve % 66,40 olarak bildirilmektedir (Togay ve ark. 1960, Yalçın ve ark.1972, Yalçın ve Ayabakan 1977, Evrim 1978, Başpınar 1985, Demir 1989a, Demir 1989b, Demir 1995, Tekerli ve ark. 2001). Ramlıç ve Dağlıç koyunlarının saf yetiştirme ve seleksiyon yoluyla verimlerinin artırılması amacıyla T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü koordinatörlüğünde Ulusal Küçükbaş Hayvan Islahı Ülkesel Projesi kapsamında Eskişehir ve Afyonkarahisar illerinde 2011 yılında başlayan projeler yürütülmektedir (Tekerli ve ark. 2016, Koçak ve ark. 2016).

Bu araştırma Afyonkarahisar ilinde yetiştirici elinde bulunan Ramlıç ve Dağlıç koyunlarda kırkım sonu canlı ağırlık, kirli yapağı verimi ve bazı yapağı özellikleri ile bunları etkileyen faktörlerin incelenmesi amacıyla yapılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Hayvan Materyali

Araştırma, Afyonkarahisar Merkez, Emirdağ ve Bolvadin ilçelerinde bulunan 296 baş Ramlıç ve 232 baş Dağlıç koyun üzerinde 2015 yılı haziran ayında yürütülmüştür. Bu çalışma 2 adet Ramlıç ve 2 adet Dağlıç sürüsünde yapılmıştır. Araştırmada kullanılan Ramlıç ve Dağlıç sürüleri Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü koordinasyonunda yürütülen Halk Elinde Küçükbaş Hayvan Islahı Ülkesel Projesine kayıtlıdır (03RAM2011-01 ve 03DAG2011-01). Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 21.05.2015 tarih ve 49533702/64 sayılı yazısı ile etik prensiplere uyumlu bulunmuştur.

Yapağı Materyali

Yapağı özelliklerinin belirlenmesi amacıyla 296 baş Ramlıç ve 232 baş Dağlıç koyundan alınan yapağı numunelerinde kirli yapağı verimi ve lüle uzunluğu değerleri belirlenmiştir. Elyaf gerçek uzunluğu ve yapağı randımanı için sürülerde her yaş grubundan (1,5; 2,5; 3,5; 4 ve üzeri) 12' şer adet olmak üzere 4 sürüde toplam 192 adet yapağı numunesi incelenmiştir.

Bakım ve Besleme

Koyunların beslenmesinde iklimsel koşullar uygun olduğu kadar meradan yararlanılmıştır. Emirdağ ilçesinde bulunan Ramlıç (1 ve 2) sürüleri ile Merkez ilçede bulunan Dağlıç (1) sürüsüne meraya ek olarak hayvan başına yaklaşık 0,5 kg arpa, buğday ve fiğden oluşan rasyon ya da hazır koyun yemi ile birlikte saman verilmiştir. Bolvadin ilçesinde bulunan Dağlıç (2) sürüsünde ise sadece kış mevsiminde hayvan başına yaklaşık 0,5 kg kesif yem ve saman verilmiştir. Koyunlarda tohumlama Temmuz - Eylül ayları arasında, doğumlar ise Ocak - Mart ayları arasında gerçekleşmiştir.

Metot

Ramlıç ve Dağlıç koyunların sağ tarafının son kaburga üstünden alınan yapağı numuneleri kilitli poşetlere konularak üzerine koyunun küpe numarası yazılmıştır. Bu numunelerden yapağı randımanı, lüle ve elyaf gerçek uzunluğu ölçümleri yapılmıştır.

Kırkım, Dağlıçlarda kırkım makası, Ramlıçlarda ise kırkım makinası ile yapılmıştır. Kırkım sonrasında canlı ağırlık ve kirli yapağı verimi tartılarak

BULGULAR

belirlenmiştir. Lüle uzunluğu, her yapağı numunesi için rastgele seçilen 10 adet lülenin uzunluğu doğal şekli bozulmadan cetvelle ölçülerek elde edilen değerlerin ortalaması, elyaf gerçek uzunluğu ise her yapağı numunesi için rastgele seçilen 100 adet kıl örneği gerdirilmeden, cetvel yardımıyla ölçülerek elde edilen değerlerin ortalaması, “cm” olarak hesaplanmıştır (Akçapınar 1988). Yapağı randımanı için kirli numunelerden 30 gram yapağı örneği ön yıkama, deterjanlı suyla yıkama, sodalı suyla yıkama ve durulama işlemlerinden geçirilmiştir. Oda sıcaklığında bekletilen numuneler daha sonra 105 °C’ de 6 saat kurutulmuştur. Kurutmadan sonra elde edilen temiz yapağı numuneleri aynı hassas terazi ile tartıldıktan sonra ağırlığı kayıt edilmiştir. Sönmez (1959) tarafından bildirilen formül yardımıyla her numune için yapağı randımanı hesaplanmıştır.

Ramlıç ve Dağlıç ırkları için ayrı olmak üzere kırkım sonu canlı ağırlık, kirli yapağı verimi, yapağı randımanı, lüle ve elyaf gerçek uzunluğunun Varyans analizinde $Y_{ijk} = \mu + S_i + Y_j + e_{ijk}$ modeli kullanılmıştır. Bu modelde; Y_{ijk} : Gözlem değerini, μ : Beklenen ortalama değeri, S_i : Sürünün etkisini ($i = 1$ ve 2), Y_j : Yaşın etkisini ($j = 1,5; 2,5; 3,5; 4$ ve üzeri) ve e_{ijk} : Rastgele hatayı ifade etmektedir. Aralarındaki farklılık önemli bulunan grupların karşılaştırılması ise Duncan Testi ile yapılmıştır. İstatistikî analizlerde SPSS for Windows programından yararlanılmıştır (Anonim 2009).

Bu çalışmada Ramlıç koyunlarda, kırkım sonu canlı ağırlık, kirli yapağı verimi, bazı yapağı özellikleri ve etkileyen faktörlere ilişkin bulgular Tablo 1’ de sunulmuştur. Ramlıçlarda kırkım sonu canlı ağırlık, kirli yapağı verimi, lüle uzunluğu, elyaf gerçek uzunluğu ve yapağı randımanı genel ortalamaları sırasıyla; $64,08 \pm 0,521$ kg, $3,07 \pm 0,051$ kg, $5,89 \pm 0,068$ cm, $8,84 \pm 0,145$ cm ve % $73,21 \pm 0,980$ olarak belirlenmiştir. Sürünün kirli yapağı verimi, lüle uzunluğu, elyaf gerçek uzunluğu ve yapağı randımanına etkisi önemli ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$) bulunmuştur. Yaşın ise kırkım sonu canlı ağırlık, kirli yapağı verimi ve elyaf gerçek uzunluğuna etkisi önemli ($p < 0,01$; $p < 0,001$) olmuştur.

Dağlıç koyunlarda, kırkım sonu canlı ağırlık, kirli yapağı verimi ve bazı yapağı özelliklerine ait değerler Tablo 2’ de sunulmuştur. Dağlıçlarda kırkım sonu canlı ağırlık, kirli yapağı verimi, lüle uzunluğu, elyaf gerçek uzunluğu ve yapağı randımanı genel ortalamaları sırasıyla; $47,78 \pm 0,442$ kg, $1,63 \pm 0,036$ kg, $9,84 \pm 0,149$ cm, $13,62 \pm 0,250$ cm ve % $73,75 \pm 0,822$ bulunmuştur. Sürünün kırkım sonu canlı ağırlık ve lüle uzunluğuna etkisi önemli ($p < 0,001$) olmuştur. Yaşın kırkım sonu canlı ağırlık, kirli yapağı verimi ve yapağı randımanına etkisi önemli ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$) bulunmuştur.

Tablo1. Ramlıç Koyunlarda kırkım sonu canlı ağırlık, kirli yapağı verimi ve bazı yapağı özelliklerine ait değerler
Table 1. Body weight after shearing, greasy fleece weight and some fleece traits of Ramlıç Sheep

Faktörler	Kırkım sonu canlı ağırlık (kg)		Kirli yapağı verimi (kg)		Lüle uzunluğu (cm)		Elyaf gerçek uzunluğu (cm)		Yapağı randımanı (%)	
	n	$\bar{X} \pm S_x$	n	$\bar{X} \pm S_x$	n	$\bar{X} \pm S_x$	n	$\bar{X} \pm S_x$	n	$\bar{X} \pm S_x$
μ	296	$64,08 \pm 0,521$	296	$3,07 \pm 0,051$	296	$5,89 \pm 0,068$	96	$8,84 \pm 0,145$	96	$73,21 \pm 0,980$
Sürü		-		**		*		***		***
1	101	$64,84 \pm 0,837$	101	$3,20 \pm 0,83^a$	101	$5,75 \pm 0,109^b$	48	$9,47 \pm 0,205^a$	48	$78,46 \pm 1,386^a$
2	195	$63,31 \pm 0,604$	195	$2,93 \pm 0,06^b$	195	$6,03 \pm 0,079^a$	48	$8,20 \pm 0,205^b$	48	$67,96 \pm 1,386^b$
Yaş		***		***		-		**		-
1,5	69	$57,19 \pm 0,997^c$	69	$2,92 \pm 0,098^{bc}$	69	$5,65 \pm 0,130$	24	$8,54 \pm 0,290^b$	24	$74,62 \pm 1,960$
2,5	52	$63,88 \pm 1,151^b$	52	$3,32 \pm 0,114^a$	52	$5,94 \pm 0,150$	24	$9,73 \pm 0,290^a$	24	$73,78 \pm 1,960$
3,5	70	$66,10 \pm 1,027^b$	70	$3,19 \pm 0,101^{ab}$	70	$5,92 \pm 0,134$	24	$8,40 \pm 0,290^b$	24	$72,87 \pm 1,960$
4 ve üzeri	105	$69,14 \pm 0,815^a$	105	$2,84 \pm 0,108^c$	105	$6,05 \pm 0,107$	24	$8,68 \pm 0,290^b$	24	$71,59 \pm 1,960$

-:Önemli değil ($p > 0,05$), *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$

^{a, b, c}: Aynı sütunda her alt grupta farklı harfleri taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir ($p < 0,05$).

Tablo 2. Dağlıç Koyunlarda kırkım sonu canlı ağırlık, kirli yapağı verimi ve bazı yapağı özelliklerine ait değerler
Table 2. Body weight after shearing, greasy fleece weight and some fleece traits of Dağlıç Sheep

Faktörler	Kırkım sonu canlı ağırlık (kg)		Kirli yapağı verimi (kg)		Lüle uzunluğu (cm)		Elyaf gerçek uzunluğu (cm)		Yapağı randımanı (%)	
	n	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	n	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	n	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	n	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	n	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$
μ	232	47,78±0,442	232	1,63±0,036	232	9,84±0,149	96	13,62±0,250	96	73,75±0,822
Sürü	***		-		***		-		-	
1	132	52,59±0,555 ^a	132	1,63±0,045	132	8,96±0,187 ^b	48	13,41±0,354	48	74,69±1,163
2	100	42,96±0,622 ^b	100	1,62±0,051	100	10,72±0,209 ^a	48	13,82±0,354	48	72,81±1,163
Yaş	***		*		-		-		**	
1,5	48	42,33±0,852 ^d	48	1,81±0,070 ^a	48	9,73±0,287	24	13,63±0,500	24	74,44±1,645 ^{ab}
2,5	40	46,64±0,932 ^c	40	1,53±0,076 ^b	40	9,73±0,313	24	12,82±0,500	24	78,10±1,645 ^a
3,5	29	49,43±1,094 ^b	29	1,55±0,089 ^b	29	10,34±0,368	24	13,79±0,500	24	70,68±1,645 ^b
4 ve üzeri	115	52,72±0,552 ^a	115	1,61±0,045 ^{ab}	115	9,56±0,186	24	14,23±0,500	24	71,78±1,645 ^b

-:Önemli değil ($p>0,05$), * : $p<0,05$; ** : $p<0,01$; *** : $p<0,001$

^{a, b, c, d}: Aynı sütunda her alt grupta farklı harfleri taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir ($p<0,05$).

TARTIŞMA

Ramlıç koyunlarda kırkım sonu canlı ağırlık genel ortalaması 64,08 kg tespit edilmiş olup Ramlıç için bildirilen (Demir 1989a, Demir 1995) değerlerden yüksektir. Bu durum, bakım ve beslemenin iyileştirilmesi ile büyümenin hızlandırılmasına yönelik çalışmalardan kaynaklanmış olabilir. Nitekim Afyonkarahisar ilinde yürütülen “Ramlıç Koyunlarının Halk Elinde Islahı” projesinde 6. ve 12. ay canlı ağırlığın yıllar içerisinde yükseldiği bildirilmektedir (Tekerli ve ark. 2016). Ayrıca Ramlıç koyunların kırkım sonu canlı ağırlık genel ortalaması, Akkaraman (53,5 - 54,7 kg), İvesi (52,9 kg), Kıvırcık (45,5), Orta Anadolu Merinosu (60,05 kg) ve Acıpayam (54,6 kg) koyunları için bildirilen kırkım sonu canlı ağırlık değerlerinden (Sönmez ve ark. 1975, Ünal ve Akçapınar 2001, Elibol ve Dağ 2004, Ünal ve ark. 2004, Yüceer ve ark. 2010) yüksektir. Ramlıç koyun sürülerinde belirlenen kırkım sonu canlı ağırlık değerleri 1. ve 2. sürü için 64,84 ve 63,31 kg olup aralarındaki farklılık istatistikî olarak önemli değildir. Kırkım sonu canlı ağırlık değerleri 1,5; 2,5; 3,5 ve 4 üzeri yaşlı Ramlıçlar için sırasıyla; 57,19; 63,88; 66,10 ve 69,14 kg olup gruplar arasındaki farklılık istatistikî bakımdan önemli ($p<0,001$) bulunmuştur. Yaş ilerledikçe kırkım sonu canlı ağırlık artmaktadır. Bu araştırma sonuçlarına benzer şekilde farklı koyun ırklarında yapılan çalışmalarda kırkım sonu canlı ağırlığa yaşın etkisinin önemli olduğu bildirilmektedir (Elibol ve Dağ 2004, Ünal ve ark. 2004).

Bu çalışmada Ramlıç koyunların kirli yapağı verimi genel ortalaması 3,07 kg olarak belirlenmiştir. Bu değer Ramlıç için bildirilen (Yalçın 1982, Demir 1989b, Demir 1995) kirli yapağı verimi (2,82-3,17 kg) aralığındadır. Sürülere göre Ramlıçlarda kirli yapağı verimi 1. ve 2. sürü için 3,20 ve 2,93 kg tespit edilmiş olup farklılık istatistikî olarak önemli ($p<0,01$) bulunmuştur. Yaş gruplarına göre kirli yapağı verim ortalamaları 1,5; 2,5; 3,5 ve 4 üzeri yaşlı Ramlıçlar için sırasıyla; 2,92; 3,32; 3,19 ve 2,84 kg olarak belirlenmiştir. Yaş grupları arasındaki farklılık istatistikî bakımdan önemlidir ($p<0,001$). Benzer şekilde farklı koyun ırklarında yapılan çalışmalarda yaşın kirli yapağı verimine etkisinin önemli olduğu bildirilmektedir (Sönmez ve ark. 1975, Çolakoglu ve Özbeyaz 1999, Ünal ve ark. 2004, Yıldız ve Denk 2006). Ramlıç ırkı için elde edilen kirli yapağı verimi Akkaraman, İvesi, Karayaka ve Kıvırcık ırkı için bildirilen değerlerden yüksek, Karacabey ve Orta Anadolu Merinosu ile Acıpayam koyunundan düşüktür (Özcan 1970, Öznacar 1973, Sönmez ve ark. 1975, Çolakoglu ve Özbeyaz 1999, Koyuncu ve ark.1999, Ünal ve Akçapınar 2001, Elibol ve Dağ 2004, Ünal ve ark. 2004, Yıldız ve Denk 2006, Garip ve ark. 2010, Yüceer ve ark. 2010).

Ramlıçlarda lüle uzunluğu genel ortalaması 5,89 cm olarak hesaplanmıştır. Bu değer Ramlıçlar için bildirilen (Yalçın 1982, Demir 1989b, Demir 1995) lüle uzunluğundan düşük olup bakım, besleme ve ölçüm yönteminin farklılığından kaynaklanmış olabilir. Araştırmanın yürütüldüğü Ramlıç sürülerinde lüle uzunluğu ortalamaları 1. ve 2. sürü

için, 5,75 ve 6,03 cm olup farklılık istatistikî bakımdan önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. Lüle uzunluğu ortalamaları 1,5; 2,5; 3,5 ve 4 üzeri yaşlı Ramlıçlar için sırasıyla; 5,65; 5,94; 5,92 ve 6,05 cm'dir. Yaş grupları arasındaki farklılık istatistikî olarak önemli değildir. Ünal ve ark. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada da lüle uzunluğu bakımından yaş farklılığının önemsiz olduğu bildirilmiştir. Ramlıçlar için belirlenen lüle uzunluğu genel ortalaması Akkaraman, Karayaka, Kıvırcık, Anadolu ve Karacabey Merinosu için bildirilen değerlerden düşük olmuştur (Özcan 1970, Sönmez ve ark. 1975, Öznacar 1973, Dellal ve ark. 2000, Yıldız ve Denk 2006, Gürgen 2008).

Ramlıç koyunlarda elyaf gerçek uzunluğu genel ortalaması 8,84 cm'dir. Bu değer Akkaraman, İvesi, Karayaka ve Anadolu Merinosu için bildirilen elyaf uzunluğu değerinden düşük, Morkaraman ırkından ise yüksek bulunmuştur (Çolakoğlu ve Özbeyaz 1999, Koyuncu ve ark. 1999, Dellal ve ark. 2000, Küçük ve ark. 2000, Elibol ve Dağ 2004, Gürgen 2008). Bu durum ırk ve ölçüm yöntemlerinin farklılığından kaynaklanmış olabilir. Ramlıçlarda elyaf gerçek uzunluğu ortalamaları 1. ve 2. sürü için 9,47 ve 8,20 cm olup farklılık istatistikî bakımdan önemli ($p<0,001$) bulunmuştur. Yaş gruplarına göre Ramlıç koyunlarda elyaf gerçek uzunluğu ortalamaları 1,5; 2,5; 3,5 ve 4 üzeri yaşlılar için sırasıyla; 8,54; 9,73; 8,40 ve 8,68 cm'dir. Yaş grupları arasındaki farklılık istatistikî bakımdan önemlidir ($p<0,01$). Bu durum, Küçük ve ark. (2000)'nın yaşı elyaf gerçek uzunluğuna etkisinin önemli olduğu bildiriyle uyumludur.

Ramlıç koyunlarda yapağı randımanı genel ortalaması % 73,21 olarak tespit edilmiştir. Bu değer Ramlıçlar için bildirilen (Yalçın 1982, Demir 1995) yapağı randımanı değerlerinden (% 54,0 - 57,2) yüksektir. Bu durum araştırmalarda kullanılan yöntem farklılığından kaynaklanmış olabilir. Ayrıca Akkaraman, Karayaka, Kıvırcık, Morkaraman ve Anadolu Merinosu için bildirilen (Sönmez ve ark. 1975, Çolakoğlu ve Özbeyaz 1999, Koyuncu ve ark. 1999, Dellal ve ark. 2000, Küçük ve ark. 2000, Gürgen 2008, Garip ve ark. 2010) yapağı randımanı değerlerinden de yüksektir. Ramlıç koyunlarda yapağı randımanı ortalamaları 1. ve 2. sürü için % 78,46 ve 67,96 olup farklılık istatistikî bakımdan önemli ($p<0,001$) bulunmuştur. Birinci Ramlıç sürüsünde elyaf uzunluğu ve kirli yapağı veriminin yüksek olmasının yapağı randımanının artmasına neden olduğu düşünülmektedir. Ramlıç koyunlarda yapağı randımanı ortalamaları 1,5; 2,5; 3,5 ve 4 üzeri yaşlılar için sırasıyla; % 74,62; 73,78; 72,87 ve 71,59'tır. Küçük ve ark. (2000)'nın bildirimlerine benzer şekilde yaş grupları arasındaki farklılık istatistikî bakımdan önemli değildir.

Türkiye yerli koyun ırkları içinde yağlı kuyruklu ve küçük yapılı olarak ifade edilen Dağlıçlarda kırkım sonu canlı ağırlık genel ortalaması 47,78 kg bulunmuştur. Bu değer aynı ırk için bildirilen (Togay ve ark. 1960, Yalçın ve ark. 1972, Yalçın ve Ayabakan 1977, Evrim 1978, Başpınar 1985, Demir 1989a, Demir 1995) değerlerden (30,4 - 39,7 kg) yüksek olmuştur. Dağlıçlarda belirlenen kırkım sonu canlı ağırlık değerinin daha önceki araştırmalarda bildirilenlerden yüksek olması bakım ve besleme şartlarının iyileştirilmesi ile açıklanabilir. Ayrıca büyümenin hızlandırılmasına yönelik yürütülen çalışmaların canlı ağırlık artışına katkı sağladığı düşünülmektedir. Nitekim Afyonkarahisar ilinde yürütülen "Dağlıç Koyunlarının Halk Elinde Islahı" projesinde 6. ve 12. ay canlı ağırlığın yıllar içerisinde yükseldiği bildirilmektedir (Koçak ve ark. 2016). Araştırmanın yapıldığı 1. ve 2. sürüde kırkım sonu canlı ağırlık ortalamaları 52,59 ve 42,96 kg olarak tespit edilmiştir. Birinci sürü merkez ilçede bulunmakta olup 2. sürüye göre bakım ve besleme imkânları daha iyidir. Dağlıçlarda kırkım sonu canlı ağırlık ortalamaları 1,5; 2,5; 3,5 ve 4 üzeri yaşlı koyunlarda sırasıyla; 42,33; 46,64; 49,43 ve 52,72 kg olmuş ve gruplar arasındaki farklılık önemli ($p<0,001$) bulunmuştur. Bu durum, farklı araştırmalarda kırkım sonu canlı ağırlığa yaşı etkisinin önemli olduğu bildirimlerine (Elibol ve Dağ 2004, Ünal ve ark. 2004) benzerdir. Dağlıçlarda belirlenen kırkım sonu canlı ağırlık değeri Akkaraman (53,5-54,7 kg), İvesi (52,9 kg) Orta Anadolu Merinosu (60,05 kg) ve Acıpayam (54,6 kg) koyunları için bildirilenlerden (Ünal ve Akçapınar 2001, Elibol ve Dağ 2004, Ünal ve ark. 2004, Yüceer ve ark. 2010) düşüktür. Dağlıç koyunu yerli koyun ırkları içerisinde küçük yapılı bir ırk olup beklenen bir durumdur.

Dağlıç koyunlarda kirli yapağı verimi genel ortalaması 1,63 kg olarak hesaplanmıştır. Bu değer farklı araştırmalarda Dağlıçlar için bildirilen (Togay ve ark. 1960, Yalçın ve ark. 1972, Yalçın ve Ayabakan 1977, Başpınar 1985, Demir 1989b, Demir 1995, Tekerli ve ark. 2001) kirli yapağı verimi değeri (1,50-2,68 kg) aralığındadır. Dağlıç sürülerinde belirlenen kirli yapağı verimi ortalamaları 1. ve 2. sürü için 1,63 ve 1,62 kg olup aralarındaki farklılık istatistikî olarak önemli değildir. Dağlıç koyunlarda kirli yapağı verimi 1,5; 2,5; 3,5 ve 4 üzeri yaşlılar için sırasıyla; 1,81; 1,53; 1,55 ve 1,61 kg olmuştur. Yaş grupları arasındaki farklılık istatistikî bakımdan önemli ($p<0,05$) olup 3,5 yaşına kadar kirli yapağı veriminde bir azalma olduğu görülmektedir. Farklı koyun ırklarında yapılan çalışmalarda da kirli yapağı verimine yaşı etkisinin önemli olduğu bildirilmektedir (Sönmez ve ark. 1975, Çolakoğlu ve Özbeyaz 1999, Elibol ve Dağ 2004, Ünal ve ark. 2004, Yıldız ve Denk 2006). Dağlıç ırkı için elde edilen kirli yapağı verimi

Akkaraman, İvesi, Karayaka, Kıvırcık, Karacabey ve Orta Anadolu Merinosu ile Acıpayam koyunundan düşük bulunmuştur (Öznacar 1973, Sönmez ve ark. 1975, Çolakoğlu ve Özbeyaz 1999, Koyuncu ve ark.1999, Ünal ve Akçapınar 2001, Elibol ve Dağ 2004, Ünal ve ark. 2004, Yıldız ve Denk 2006, Gürgen 2008, Garip ve ark. 2010, Yüceer ve ark. 2010).

Dağlıç koyunlarda, lüle uzunluğu genel ortalaması 9,84 cm bulunmuştur. Bu değer, Dağlıçlar için bildirilen (Togay ve ark. 1960, Yalçın ve ark. 1972, Yalçın ve Ayabakan 1977, Evrim 1978, Başpınar 1985, Demir 1989b, Demir 1995) lüle uzunluğu değerlerinden (12,28 - 22,71 cm) düşüktür. Bu durum bakım, besleme ve araştırmalarda kullanılan yöntem farklılığından kaynaklanmış olabilir. Dağlıç sürülerinde lüle uzunluğu değerleri 1. ve 2. sürü için 8,96 ve 10,72 cm olup farklılık istatistikî bakımdan önemli ($p<0,001$) bulunmuştur. Yaş gruplarına göre Dağlıç koyunlarda lüle uzunluğu ortalamaları 1,5; 2,5; 3,5 ve 4 üzeri yaşlılar için sırasıyla; 9,73; 9,73; 10,34 ve 9,56 cm'dir. Ünal ve ark. (2004)'nın bildirimlerine benzer şekilde lüle uzunluğu bakımından yaş grupları arasındaki farklılık istatistikî olarak önemli değildir. Dağlıçlar için bulunan lüle uzunluğu değeri Akkaraman, Kıvırcık, Karacabey ve Anadolu Merinosundan yüksek, Karayaka ırkından ise düşük olmuştur (Özcan 1970, Öznacar 1973, Sönmez ve ark. 1975, Dellal ve ark. 2000, Yıldız ve Denk 2006, Gürgen 2008).

Dağlıç koyunlarda, elyaf gerçek uzunluğu genel ortalaması 13,62 cm olarak tespit edilmiştir. Bu değer Karayaka, İvesi ve Akkaraman için bildirilen elyaf uzunluğu değerlerinden düşük, Morkaraman ve Anadolu Merinosu için bildirilen değerlerden yüksek olmuştur (Çolakoğlu ve Özbeyaz 1999, Koyuncu ve ark. 1999, Dellal ve ark. 2000, Küçük ve ark. 2000, Ünal ve Akçapınar 2001, Elibol ve Dağ 2004, Gürgen 2008). Elyaf gerçek uzunluğu ortalamaları 1. ve 2. sürü için 13,41 ve 13,82 cm olup farklılık istatistikî bakımdan önemli değildir. Dağlıç koyunlarda elyaf gerçek uzunluğu ortalamaları 1,5; 2,5; 3,5 ve 4 üzeri yaşlılar için sırasıyla; 13,63; 12,82; 13,79 ve 14,23 cm'dir. Elyaf gerçek uzunluğu değeri 3,5 yaşından itibaren yükselmiştir. Gürgen (2008) in bildirimlerine benzer şekilde yaş grupları arasındaki farklılık istatistikî bakımdan önemli değildir.

Dağlıç koyunlarda, yapağı randımanı genel ortalaması % 73,75 'dir. Bu değer, Demir (1995) tarafından Dağlıç yapağıları için bildirilen % 66,4' ten yüksektir. Bu durum kullanılan yöntem farklılığından kaynaklanmış olabilir. Ayrıca Akkaraman, Karayaka, Kıvırcık, Morkaraman ve Anadolu Merinosu yapağıları için bildirilen (Sönmez ve ark. 1975, Çolakoğlu ve Özbeyaz 1999, Koyuncu ve ark. 1999, Dellal ve ark. 2000, Küçük

ve ark. 2000, Gürgen 2008, Garip ve ark. 2010) yapağı randımanı değerlerinden de yüksektir. Yapağı randımanı ortalamaları 1. ve 2. sürü için % 74,69 ve 72,81 olup farklılık istatistikî olarak önemli değildir. Dağlıç koyunlarda yapağı randımanı ortalamaları 1,5; 2,5; 3,5 ve 4 üzeri yaşlılar için sırasıyla; % 74,44; 78,10; 70,68 ve 71,78 olup farklılık istatistikî bakımdan önemlidir ($p<0,01$).

SONUÇ

Sonuç olarak Ramlıç ve Dağlıç koyunlarda kırkım sonu canlı ağırlığın daha önceki çalışmalarda aynı ırklar için bildirilen değerlerden yüksek olduğu, Ramlıç ırkının orta irilikte ve Dağlıçların ise küçük yapılı olduğu söylenebilir. Elyaf ve lüle uzunluğu bakımından Ramlıç yapağılarının kumaş üretiminde, Dağlıç yapağılarının ise halı sanayinde kullanılabileceği kanaatine varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın yürütülmesinde desteklerinden dolayı T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne, Halk Elinde Küçükbaş Hayvan Islahı Projesi araştırma ekibi ve teknik elemanları ile yetiştiricilere teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Anonim.** PASW Statistical Program, Version 18.0, USA, 2009.
- Anonim.** TÜİK, Hayvansal Üretim İstatistikleri, 2016 Yılı Verileri.
- Erişim: [<http://www.tuik.gov.tr>]. Erişim Tarihi: 21.08.2017.
- Akçapınar H.** Yapağı bilgisi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Teksir 87/88-16, Ankara, 1988.
- Akçapınar H.** Koyun yetiştiriciliği. Medisan Yayınevi, Ankara, 1994.
- Başpınar H.** Türkiye'deki başlıca koyun ırklarının yarı-entansif koşullardaki döl, süt ve yapağı verim performansları üzerinde mukayeseli bir araştırma. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1985; 11(2): 43-66.
- Çolakoğlu N, Özbeyaz C.** Akkaraman ve Malya koyunlarının bazı verim özelliklerinin karşılaştırılması. Turkish Journal Of Veterinary and Animal Sciences, 1999; 23: 351-360.
- Dellal G, Söylemezoğlu F, Etikan S, Erdoğan Z.** Anadolu Merinosu koyunlarının bazı yapağı özellikleri üzerine bir araştırma. Tarım Bilimleri Dergisi, 2000; 6(2): 48-53.

- Demir H.** Dağlıç ve Ramlıç koyunlarının önemli verim özellikleri yönünden karşılaştırılması: I. Büyüme, yaşama gücü ve canlı ağırlık. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1989a; 15(1): 23-38.
- Demir H.** Dağlıç ve Ramlıç koyunlarının önemli verim özellikleri yönünden karşılaştırılması: II. Döl verimi, süt verimi ve yapağı özellikleri. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1989b; 15(1): 39-52.
- Demir H.** Ramlıç ve Dağlıç koyunlarının melezlenmesi ile elde edilen çeşitli genotiplerin karşılaştırılması. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1995; 21(1): 131-141.
- Elibol M, Dağ B.** Ereğli Koyunculuk Üretme İstasyonunda yetiştirilen Akkaraman, İvesi ve İvesi x Akkaraman melezi (F₁ ve IG₁) koyunlarında kırkım sonu canlı ağırlık ve bazı yapağı verim özelliklerini etkileyen faktörlerin parametrelerinin tahmini, S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi, 2004; 18(34): 1-10.
- Evrin M.** Dağlıç koyun ırkının verimlerinin seleksiyonla geliştirilme olanakları I. Genel verim düzeyi. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1978; 4(1):1-16
- Garip M, Coşkun B, Polat ES, Yılmaz A, Tekin ME, Çağlayan T, Kılıç N.** Kangal Akkaraman koyunlarında yapağı özellikleri. Eurasian Journal Veterinary Sciences, 2010; 26(2): 93-99.
- Gürgen S.** Tokat yöresinde yetiştirilen Karayaka koyunlarında yapağı verimi ve bazı fiziksel özellikleri. Gazi Osmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Tokat, 2008.
- Kaymakçı M.** İleri Koyun Yetiştiriciliği. Genişletilmiş İkinci Baskı, Bornova-İzmir, 2006
- Koçak S, Tekerli M, Erdoğan M, Çelikeloğlu K, Hacan Ö, Bozkurt Z.** Halk Elinde Küçükbaş Hayvan Islahı Ülkesel Projesi, Dağlıç koyunlarının halk elinde ıslahı projesi kesin raporu, T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, 2016.
- Koyuncu M, Duru S, Erdoğan T.** Karayaka erkek toklularının yapağı verim özellikleri. Hayvansal Üretim Dergisi, 1999; 39(40): 24-29.
- Küçük M, Yılmaz O, Ateş CT.** Morkaraman, Hamdani ve karagül yapağlarının halı tipi yapağı özelliklerine göre değerlendirilmesi. Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, 2000; 11(2): 54-59.
- Özcan H.** İnanlı İnekhaneinde Kıvırcık koyunlarının beden yapısı, yavru ve yapağı verimleri ve önemli yapağı karakterleri üzerinde araştırmalar. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1970; 17(4): 467-483.
- Öznacar K.** Karacabey Merinoslarında yapağı yönünden seleksiyon imkânları. Lalahan Zootečni Araştırma Enstitüsü Dergisi, 1973; 13 (1-2): 3-33.
- Sönmez R.** Yapağının muayene ve değerlendirilmesinde kullanılan muhtelif metodlar ve bunların birbirleri ile mukayesesi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. No:151, Ankara, 1959.
- Sönmez R, Alpbaz AG, Sarıcan C, Kızılay E.** Kıvırcık koyunlarının süt yönünde ve yapağı-et yönünde saf yetiştirme ve melezleme yolu ile ıslahı, TÜBİTAK Projesi kesin raporu, 1975.
- Tekerli M, Akcan A, Akıncı Z, Gündoğan M.** Akkaraman, Dağlıç, Sakız ve İvesi koyunlarının Afyon koşullarındaki verim özelliklerinin belirlenmesi. TÜBİTAK-VHAG-1388 ve 98VF02 projeleri kesin raporu, AKÜ Yayın No:34, 2001.
- Tekerli M, Koçak S, Erdoğan M, Çelikeloğlu K, Hacan Ö, Bozkurt Z.** Halk Elinde Küçükbaş Hayvan Islahı Ülkesel Projesi, Ramlıç koyunlarının halk elinde ıslahı projesi kesin raporu, T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, 2016.
- Togay C, Utkanlar N, İmeryüz F, Örkiz M.** Çifteler Harası Dağlıç koyunlarının beden ölçüleri ve bazı yapağı özellikleri üzerinde araştırmalar. Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 1960; 10: 54-73.
- Ünal N, Akçapınar H.** Orta Anadolu Merinoslarında önemli verim özellikleri ve seleksiyonla geliştirilmesi imkânları I. Önemli verim özellikleri. Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 2001; 41 (1): 45 - 58
- Ünal N, Akçapınar H, Atasoy F, Koçak S, Aytaç M.** Akkaraman, Sakız x Akkaraman ve Kıvırcık x Akkaraman melezleri (F₁ ve G₁) ile Karayaka ve Bafra koyunlarda canlı ağırlık ve yapağı özellikleri. Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 2004; 44(2): 15-22
- Yalçın BC.** Rambouillet x Dağlıç melezlemesi ile geliştirilmiş et-yapağı yönlü yeni bir koyun tipi: Ramlıç. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1982; 8(2): 5-15.

Yalçın BC, Ayabakan Ş. Dağlıç koyunlarının verimlerinin geliştirilmesinde Rambouillet ırkından yararlanma olanakları II. Canlı ağırlık, yapağı verimi ve yapağı özellikleri. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1977; 3(1-2): 28-45.

Yalçın BC, Ayabakan Ş, Sincer N, Köseoğlu H. Dağlıç ve Rambouillet x Dağlıç (F1) melezlerinin önemli verim özellikleri bakımından karşılaştırılması. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1972; 19(3): 371-387.

Yıldız N, Denk H. Van bölgesinde halk elinde yetiştirilen Akkaraman koyunlarının çeşitli verim özelliklerinin araştırılması 2. Kirli yapağı verimleri, lüle uzunlukları, beden ölçüleri, kuzuların doğum ağırlıkları ve yaşama güçleri. F.Ü Sağlık Bilimleri Dergisi, 2006; 20(1): 29-37.

Yüceer B, Akçapınar H, Özbaşer FT. Acıpayam Koyunlarında canlı ağırlık ve yapağı özellikleri. Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 2010; 50(2): 73-80.

The Levels of Some Biochemical Parameters in Anatolian Buffaloes With Trichophytosis[#]

Mustafa KABU*¹ Halit B. KOCA²

¹Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, Afyonkarabisar, Turkey

²Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Afyon Kocatepe University, Afyonkarabisar, Turkey

[#]Part of this study was presented as abstract in 8th Asian Buffalo Congress (İstanbul 2015)

*Corresponding author e-mail: mustafakabu@hotmail.com

ABSTRACT

The aim of this study is to identify some biochemical parameters levels in Anatolian buffaloes with trichophytosis. The material occur forty Anatolian buffaloes divided in two groups, fifteen Anatolian buffaloes placed in control group and remaining twenty five Anatolian buffaloes served as experimental group, diagnosed as trichophytosis following clinical and microbiological examination. Serum produced from the blood taken out the vena jugularis of all the Anatolian buffaloes. Serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma-glutamyltransferase (GGT), total protein (TP), albumin (ALB), blood urea nitrogen (BUN), total bilirubin (TBil) and creatine concentrations in the serum were measured by using commercial kits. While Anatolian buffaloes with trichophytosis serum ALT and AST levels were found higher ($p<0.05$) than the control group. BUN and creatine levels were found higher ($p<0.05$) in the control group. Besides, there were no difference found between the groups regarding the TP, ALB, TBil and GGT concentrations. As a result, while trichophytosis in Anatolian buffaloes causes ALT and AST concentrations to increase, it decreases the BUN and creatine concentrations. It is thought that this situation takes place as a result of the bad effect of trichophytosis on liver.

Keyword: Anatolian buffalo, trichophytosis, ALT, AST, BUN

Trikofitozisli Anadolu Mandalarında Bazı Biyokimyasal Parametrelerin Seviyeleri

ÖZ

Bu çalışmanın amacı trikofitozisli Anadolu mandalarında bazı biyokimyasal parametrelerin seviyelerinin belirlenmesidir. Çalışmada kırk adet Anadolu mandası iki guruba ayrıldı, on beş Anadolu mandası kontrol grubunda iken geriye kalan yirmi beş Anadolu mandası çalışma grubunda yer aldı, bu gruptaki hayvanlarda klinik ve mikrobiyolojik olarak trikofitozis teşhis edilmişti. Anadolu mandalarının vena jugularislerinden alınan kanlardan serum elde edildi. Serum aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), gama-glutamiltransferaz (GGT), total protein (TP), albumin (ALB), kan üre nitrojen (BUN), total bilirubin (TBil) ve kreatin konsantrasyonları ticari kitler kullanılarak ölçüldü. Trikofitozisli Anadolu mandalarında serum ALT ve AST konsantrasyonları kontrol gurubundan daha yüksek ($p<0.05$) tespit edildi. BUN ve kreatin konsantrasyonları kontrol grubunda daha yüksekti ($p<0.05$). Ayrıca TP, ALB, TBil ve GGT konsantrasyonlarında gruplar arasında farklılık yoktu. Sonuç olarak trikofitozis, Anadolu mandalarında ALT ve AST konsantrasyonlarını yükseltirken, BUN ve kreatin konsantrasyonlarını düşürdü. Bu durumun trikofitozisin karaciğer üzerinde oluşturduğu olumsuz etkiden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Anadolu mandası, trikofitozis, ALT, AST, BUN

To cite this article: Kabu B. Koca H.B. The Levels of Some Biochemical Parameters in Anatolian Buffaloes With Trichophytosis. Kocatepe Vet J. (2018) 11(2): 156-159.

INTRODUCTION

Trichophytosis is a group of outside infection of keratinized tissues such as leather, bristle, feather and hoofs in humans and animals (Aslan et al. 2010, Kabu and Sayın 2016). Kabu and Sayın (2016) reported that Anatolian buffaloes was trichophytosis. The infection causes dermatophytosis, wholemeal, topical alopecic, circle, intense, whitish and erythematous lesions were sighted all body, specially in the head and neck area in Anatolian buffaloes, this situation resulting in important economic damage because the infection contaminates from one buffalo to other very quickly once it arrive the buffaloes herd (Kabu and Sayın 2016, Birdane and Kabu 2018). Trichophytosis, widely known as ringworm, majorly occurs from *Trichophyton verrucosum* and *Trichophyton mentagrophytes* (Scott 1994). The infection mostly contaminates with the contact to infected and susceptible animals or because of defiled mediums like bedding or walls (Scott 1994). Trichophytosis which is also known as Ringworm is a mycotic infection of keratinized tissues resulting in zoophilic dermatophytes in humans and animals (Efuntoyey and Fashanu 2001, Biberstein and Hirsh 2004, Krakhecke et al. 2005). It is characterized by the thickening of Ruminant epithelial layer and hair loss due to infection (Çenesiz et al. 2007). Whole domestic animals are susceptible to Trichophytosis infections (Yilmazer and Aslan 2010). Trichophytosis is also epidemic and zoonotic infection (Papini et al. 2009, Yilmazer and Aslan 2010). Fungal spores can survive 2-3 years (Gudding and Lund 1995). Consequently, teen, poor and immunosuppressive animals are supposably to be infected. As some researchers reported that Trichophytosis altered some biochemical parameters in ruminants (Yıldırım et al. 2010), some others reported that it did not cause any changes (Arslan et al. 2007). Our study aimed to determine the changes caused by trichophytosis in biochemical parameters at Anatolian buffaloes.

MATERIALS and METHODS

Animal and Biochemical Analysis

In this study the material take place of twenty five Anatolian buffaloes clinically and microbiologically diagnosed as trichophytosis and fifteen healthy Anatolian buffaloes. In clinical examinations of Anatolian buffaloes with trichophytosis, wholemeal, topical alopecic, circle, intense, whitish and erythematous lesions were sighted all body, specially in the head and neck area in anatolian buffaloes. There were not any skin lesions on the healthy animals. Serum aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyltransferase (GGT), alanine aminotransferase (ALT), total protein (TP),

albumin (ALB), blood urea nitrogen (BUN), total bilirubin (TBil) and creatine concentrations in the serum were measured by using commercial kits.

Sampling and Mycological Analysis

Skin and hair samples collected from the lesion Dermatophytosis in Anatolian buffaloes were cultured in Saboraud Dextrose Agar with 0,5% Chloramphenicol (CM0041). Cultures were incubated at 20 °C for 7 days. At the end of the incubation, growing colonies were taken on a loop and lam, and stained with Malachite green. Having been examined under a light microscope, the preparations were typed according to their hyphae structures and colony morphology (Koneman and Roberts 1985).

Statistical Analysis.

Statistics was used for data analyses. The Mann-Whitney U-test used to compare mean differences between groups. A Wilcoxon signed-rank test performed after a Friedman test to determine where significance occurred within group variables. A significance level of $p < 0.05$ used. To avoid type 1 alpha errors, Bonferroni correction used for the Wilcoxon signed-rank test.

RESULTS

In clinical examinations of Anatolian buffaloes with trichophytosis; wholemeal, topical alopecic, circle, intense, whitish and erythematous lesions were sighted all body, specially in the head and neck area. Skin and hair samples were examined under a light microscope, the preparations typed according to their hyphae structures and colony. While Anatolian buffaloes with trichophytosis serum ALT and AST levels found higher ($p < 0.05$) than the control group. BUN and creatine levels found higher ($p < 0.05$) in the control group. Besides, there were no difference found between the groups regarding the TP, ALB, TBil, GGT concentrations (Table 1).

DISCUSSION

Trichophytosis is a group of outside infection of keratinized tissues such as leather, bristle, feather and hoofs in humans and animals (Aslan et al. 2010, Kabu and Sayın 2016). Kabu and Sayın (2016) reported that Anatolian buffaloes was trichophytosis. The infection causes dermatophytosis, wholemeal, topical alopecic, circle, intense, whitish and erythematous lesions were sighted all body, specially in the head and neck area in Anatolian buffaloes, this situation resulting in important economic damage because the infection contaminates from one buffalo to

other very quickly once it arrive the buffaloes herd (Kabu and Sayın 2016, Birdane and Kabu 2018). In our study it was indicated that TP, ALB, TBil, GGT levels were numerically decreased in control groups. These were not statistically significant. Yıldırım et al. (2010) did not determine any variations in total protein (TP) and albumin (ALB) levels in ruminants with trichophytosis while they

found that the uric acid level was higher in the control group. And some researchers reported that there was no significant difference between dermatophytosis and control groups in total protein and albumin levels (Karapehlivan et al. 2007); these findings correspond to ours.

Table 1. The concentrations of some biochemical parameters in the serum of control and trichophytosis groups.

Parameters	Control (mean±SD)	Trichophytosis (mean±SD)	P
ALT (U/L)	47.65±3.05	67.15±3.84	0.002
AST (U/L)	105.43±7.04	172.32±6.70	0.000
BUN (mg/dl)	31.38±1.10	24.41±1.05	0.001
Creatine (mg/dl)	1.28±0.05	0.92±0.03	0.000
GGT (U/L)	13.75±1.35	16.15±1.13	0.242
TP (g/dl)	64.38±0,66	64.40±1.13	0.938
ALB (g/dl)	33.84±0.76	34.80±1.80	0.311
Tbil (mg/dl)	0.13±0.15	0.20±0.34	0.511

Nweze (2011) reported that trichophytosis is occasioned by fungi in the genera Epidermophyton, Microsporum and Trichophyton. There are three ecological groups of trichophytosis: anthropophilic (mostly associated with humans), zoophilic (associated with animals) and geophilic (found in the soil). But, anthropophilic species have been found to cause infections in animals. Arslan et al. (2007) reported that no changes occurred in AST, ALT, BUN and creatine levels in the cattle with trichophytosis. And in other studies at a horses with dermatophytosis, there was no significant difference between dermatophytosis and control groups in AST, ALT and GGT (Ural K et al. 2009). In our study, on the other hand, creatine level was found to be high in the control group while AST and ALT levels were high in Anatolian buffaloes with trichophytosis.

The results indicated that trichophytosis in Anatolian buffaloes increased ALT and AST concentrations whereas it reduced BUN and creatine concentrations. It has been deduced that this might have resulted from trichophytosis negative effect on the liver.

REFERENCES

- Arslan HH, Yarım GF, Yavuz O, Bas B. Positive effects of attenuated Trichophyton verrucosum strain administration in treatment of the bovine trichophytosis. Revue Méd. Vét. 2007; 158(10):509-513.
- Aslan Ö, Aksoy A, İça T. Dermatophytosisli Genç Sığırlarda Serum Çinko, Bakır ve Mangan Seviyeleri. Erciyes Üniv. Vet. Fak Derg. 2010; 7(1):29-33.
- Biberstein EL and Hirsh DC. Dermatophytes. In: Veterinary Microbiology, Hirsh, D.C., N.J. MacLachlan and R.L. Walker (Ed.). Blackwell Publishing, Oxford. 2004; pp: 273-284.
- Çenesiz S, Nisbet C, Yarım GF, Arslan HH, Çiftçi A. Serum adenosine deaminase activity and nitric oxide level in cows with trichophytosis. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 2007;54: 155-158.
- Birdane FM and Kabu M. The use of two different vaccines in the treatment of Anatolian buffaloes with trichophytosis. Indian J. Anim Res. 2018; Article inpress
- Gudding R and Lund A. Immunoprophylaxis of bovine dermatophytosis. Can. Vet. J. 1995; 36:302-306.
- Kabu M and Sayın Z. Concentrations of serum amyloid A, haptoglobin, tumour necrosis factor and interleukin-1 and -6 in Anatolian buffaloes naturally infected with dermatophytosis. Vet. Med. 2016; 61(3):133-135.
- Karapehlivan M, Uzlu E, Kaya N, Kankavi O, Ural K, Çitil. Investigation of Some Biochemical Parameters and the Antioxidant System in Calves with Dermatophytosis. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 2007; 31(2):85-89.
- Koneman EW and Roberts GD. Practical Laboratory Mycology, Baltimore, The Williams and Wilkins Co. 1985.

- Krakhecke AG, Afonso E, Ferreira JC, Candido RC.** In vitro susceptibility testing of *Microsporum gypseum* isolated from healthy cattle and soil samples against itraconazole, terbinafine, fluconazole and topical veterinarian drugs. *Mycopathologia*. 2005; 159:377-380.
- Nweze EL.** Dermatophytoses in domesticated animals *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2011; 53(2):94-9.
- Özkanlar YE, Aktaş MS, Kireççi E.** Mycozoonosis associated with Ringworm of Calves in Erzurum Province Turkey. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.* 2009; 15(1):141-144.
- Papini R, Nardoni S, Fanelli A, Mancianti F.** High Infection Rate of *Trichophyton verrucosum* in Calves from Central Italy. *Zoonoses Pub. Health*. 2009; 56:59-64.
- Scott DB.** Infectious diseases of livestock with special reference to South Africa. In: *Mycoses*, Ed, Coetzer JAW, Thomson GR, Tustin RC. Vol 2. Oxford University Press, Cape Town 1994; pp:1521-1533.
- Ural K, Yağcı B, Ocal N.** Cellular enzyme values in hunter/jumper and dressage horses with dermatophytosis. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2009; 61(5):1233-1237.
- Yıldırım M, Çınar M, Ocal N, Yağcı BB, Askar S.** Prevalence of clinical dermatophytosis and oxidative stress in cattle. *J. Anim. Vet. Adv.* 2010; 9(14):1978-1982.
- Yılmaz RE and Aslan Ö.** The Investigation of Efficacy of Neguvon-Whitfield's Ointment Combinations for the Treatment of Ringworm in Cattle. *Journal of Health Sciences*. 2010; 19(3):175-183.

Kırklareli Yöresi Süt Sığırlarında Subklinik Paratüberkülozun Seroprevalansı[#]

Banu KARAKAŞ¹, Turan CİVELEK^{2*}

¹ Sekiz Kasım Mb. Şafak Sk. Park Sit., A Blk., Lüleburgaz/ Kırklareli

² Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları AD, Merkez/ Afyonkarahisar

*Corresponding author e-mail: tcivelek@aku.edu.tr

Bu çalışma Veteriner Hekim Banu Karakaş'ın yüksek lisans tezinden (AKÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2017-019) derive edilmiştir.

ÖZ

Paratüberküloz, *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*'in neden olduğu, başlıca sığırları etkileyen kronik seyirli, bulaşıcı ve ölümcül bir hastalıktır. Hastalık uzun dönem bir subklinik evreye sahiptir. Bu evrede etken hasta hayvanlar tarafından sağlıklı hayvanlara bulaştırılabilir. Hastalık süt sığırı işletmelerinde ciddi ekonomik kayıplara yol açar. Yanı sıra, paratüberküloz olası zoonotik karakterde bir hastalık olup, insanlarda gözlenen Crohn's hastalığının temelinde rol oynayabileceği bildirilmektedir. Türkiye de bu hastalığın varlığı uzun yıllardır bilinmektedir. Sunulan çalışmada ülkemiz süt sığırı yetiştiriciliği açısından önem arz eden Kırklareli yöresinde subklinik paratüberküloz prevalansının belirlenmesi hedeflendi. Antikor tespiti serum örneklerinde ELISA yöntemiyle yapıldı. Çalışma materyalini optimal süt verimine ve canlı ağırlığa sahip, klinik olarak sağlıklı, yaşları 3-4 arasında değişen, 400 multiparoz Holştayn süt sığırı oluşturdu. Çalışma kapsamında, Kırklareli merkez dahil olmak üzere, sekiz farklı ilçede toplam 23 işletmeden randomize örnekleme gerçekleştirildi. Araştırma sonucunda, Kırklareli yöresi süt sığırlarında subklinik paratüberkülozun seroprevalansı %1.5 pozitif, %1.5 şüpheli ve %97 negatif olarak tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Paratüberkülozis, Johne hastalığı, Tüberküloz, ELISA, Trakya bölgesi.

Seroprevalence of Subclinical Paratuberculosis in Dairy Cattle in Kırklareli Region

ABSTRACT

Paratuberculosis is a contagious, chronic and deadly disease affecting the primary cattle produced by *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis*. It has a long-term subclinical phase. In this period, the disease can be transmitted to healthy animals by the patients. It raises important economical losses in dairy cattle farms. It is also reported that paratuberculosis is zoonotic and plays a key role in Crohn's disease observed in humans. The condition of the disease in Turkey has been known for many years. Purpose of this study was to define the prevalence of subclinical paratuberculosis in Kırklareli region which is important in terms of milk cattle breeding. Antibody detection was done by ELISA in serum samples. The research animal material consisted of 400 multiparous Holstein dairy cattle with optimal milk yield and live weight, clinically healthy, aged 3-4 years. Within the scope of the study, a total of 23 farms were randomly sampled in eight different districts, including the Kırklareli center. As a result of the present study, the seroprevalence of subclinical paratuberculosis was 1.5% positive, 1.5% suspected and 97% negative in Kırklareli region in dairy cattle.

Keywords: Paratuberculosis, Johne's disease, Tuberculosis, ELISA, Thrace region.

To cite this article: Karakaş B, Civelek T. Kırklareli Yöresi Süt Sığırlarında Subklinik Paratüberkülozun Seroprevalansı. Kocatepe Vet J. (2018) 11(2): 160-164.

GİRİŞ

Paratüberküloz (pTB), *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*'in (MAP) yol açtığı kronik bir hastalıktır. Ciddi ekonomik kayıplara neden olan MAP son derece bulaşıcıdır. Neonatal dönemden itibaren hayvanlar enfekte olabilmekle birlikte, klinik olgulara daha çok 2-6 yaş arasında rastlanır (Alibaşoğlu ve ark. 1969, Çetinkaya ve ark. 1997, Osterstock ve ark. 2010). Enfekte hayvanların ortalama %1'i ölümler, %50'si subklinik hasta olarak hayatına devam eder. Bu hayvanlarda dikkati çeken tek bulgu ise verim kaybıdır (Andrews 1992). Enfeksiyonun erken döneminde enfekte hayvanlar sürüdeki gençlere ve sağlıklı bireylere etkeni bulaştırırlar (Baumgartner ve Khol 2006). Hasta hayvanların sütleri ve dışkılarıyla yaydıkları etkenler dış ortamda uzun süre canlılığını koruyabilir. MAP'in enfekte hayvanlardan insanlara bulaşık su, et ve süt ürünlerinin tüketilmesiyle bulaşabileceği de rapor edilmiştir. MAP'in insanlardaki Crohn's hastalığının etiolojisinde rol aldığı araştırmacılar tarafından da önemle ifade edilmektedir (Pickup ve ark. 2004, Nakase ve ark. 2006). Etkenin pastörizasyon prosesine dirençli olması nedeniyle, süt ve süt ürünleriyle insana bulaş riski hastalıkta subklinik evreyi bilhassa önemli kılmakta ve bu dönemde teşhisin önemini arttırmaktadır (Çetinkaya ve ark. 1997, Çetinkaya ve ark. 2000, Yıldırım ve Civelek 2013).

Paratüberküloz olgularına her kıtada rastlanılmakta ve prevalansı bölgesel ve ülkesel olarak farklılık gösterebilmektedir. Avustralya'nın bazı bölgelerinin ari ve İsveç'te ise yaygınlığın nadir olduğu bildirilmiştir. Bazı araştırmalarda pTB prevalansı Almanya'da %84.7, ABD'de %50, Danimarka'da %47, Kanada'da %43 olarak rapor edilmiştir (Collins ve ark. 1994, Jakobsen ve ark. 2000, Van Leeuwen ve ark. 2001, Hacker ve ark. 2004, Holmström ve Stenlund 2005). Ülkemiz açısından ise; Orta Anadolu'daki sığırlarda paratüberkülozun seroprevalansı sırasıyla %2.3 ve %2.7 olarak ortaya konmuştur (Vural ve Atala 1988). ELISA yöntemiyle ülke genelinde yapılan diğer bir çalışmada ise hastalığın yaygınlığı %4.6 olarak rapor edilmiştir (Atala ve Akçay 2001). Kars ilinde sığırlar üzerinde yürütülen bir araştırmanın sonuçları prevalansı; %3.5 ve çiftlik bazında ise %41.6 olduğunu göstermiştir (Makav ve Gökçe 2013). Bir diğer araştırmada ise Uşak da süt sığırlarında dışkı ve süt örneklerinde, PCR tekniği ile elde edilen prevalans değerleri sırasıyla %20 ve %17.5 olarak bildirilmiştir (Yıldırım ve Civelek 2013). Manisa yöresi süt sığırlarında yapılan bir çalışmada ise subklinik paratüberkülozun seroprevalansı %4.6 olarak rapor edilmiştir (Berberoğlu ve Civelek 2016). ELISA; MAP'a karşı gelişen özel antikörlerin belirlenmesi ile paratüberküloz

tanısında en yaygın ve etkili olarak kullanılan yöntemdir (Kalis ve ark. 1999). Bu metotla, sahada yapılan çalışmalarda enfekte hayvanların %80'inin daha klinik semptom göstermeden teşhis edildiği ettiği rapor edilmektedir. Yöntem, henüz dışkılarıyla etkeni saçmayan hayvanların ise %65'ini tespit etmiştir (Jubb ve ark. 2004).

Sunulan bu çalışmada Kırklareli yöresinde ELISA metodu kullanılarak subklinik paratüberkülozun prevalansının ortaya konması hedeflenmiştir. Araştırmamızın ilgili bölge ve ülke genelinde hastalığa karşı etkili kontrol stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmekle birlikte, subklinik pTB'nin teşhisi ile bu hastalığa bağlı uzun dönemde gelişebilecek olası verim kayıplarının önüne geçilmesi de sağlanacaktır. Bu durumun ekonomik açıdan ülkemiz için oldukça önem arz ettiği düşünülmektedir.

MATERYAL VE METOT

Sunulan araştırmanın hayvan materyali; Kırklareli il merkezi ve ilçelerinde (Kırklareli Merkez; 3, Babaeski; 3, Lüleburgaz; 3, Vize; 4, Demirköy; 2, Pehlivan köyü; 4, Kofçaz; 1, Pınarhisar; 3) süt sığırı yetiştiriciliği yapılan 23 işletmeden rastgele örnekleme yöntemiyle seçildi. Örnek dağılımı; Kırklareli Merkez, n=84; Lüleburgaz, n=50; Babaeski, n=60; Vize, n=45; Pehlivan köyü, n=43; Pınarhisar, n=50; Kofçaz, n=40; Demirköy, n=28'dir. Çalışma materyalini; siklik faaliyetleri devam eden, önceki laktasyon dönemlerinde periparturient hastalık (deplasman, ketosis, retentio, hipokalsemi vb.) geçirmemiş, paratüberküloz yönünden aşılammış, klinik olarak sağlıklı, yaş, canlı ağırlık ve günlük süt verim ortalamaları sırasıyla; 3.65±0.48 yıl, 600.53±34.88 kg ve 27.55±2.75 lt. olan 400 multiparoz Holştayn ırkı süt sığırı oluşturdu. Materyali oluşturan her bir sığırdan biyokimya tüpüne kan örnekleri alındı ve santrifüj edilerek kan serumları çıkarıldı. Elde edilen örnekler analiz zamanına kadar -20 °C de saklandı. Seroprevalans tayini ELISA [Idexx Paratuberculosis Screening Ab Test, RefPO7130-5] metodu kullanılarak gerçekleştirildi. Örneklerde ölçümler, BIOTEK ELX800, USA marka ELISA okuyucu cihazda 450 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. Pozitif (P) ve negatif (N) kontrol serumlarına ait optik dansite (OD) değerlerinin aritmetik ortalaması (ortalama P, ortalama N) hesaplandı. Her bir serum örneği için S/P değeri; $S/P = (OD - \text{ortalama N}) / (\text{ortalama P} - \text{ortalama N})$ formülü ile değerlendirildi. $S/P \leq 0.60$ ise örnek negatif, $S/P \geq 0.70$ ise örnek pozitif ve $S/P = 0.6 - 0.7$ arasında ise örnek şüpheli olarak kabul edildi. Yaş, canlı ağırlık ve bir önceki laktasyon süt verimi değerlerinin istatistik hesaplanmasında non-parametrik 1 Sample (K-S) testi (SPSS 16.0 for

Windows) kullanıldı. Bu araştırma AKÜHADYEK 14.06.2016 tarih ve 49533702/107 sayılı onayı çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. Sunulan araştırma Vet. Hekim Banu Karakaş'ın yüksek lisans tezinden (AKÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2017-019) derivate edilmiştir.

BULGULAR

Çalışma kapsamında; totalde 6 sığır pozitif, 6 sığır şüpheli ve 388 sığır ise negatif olarak belirlendi. Pozitif ve şüpheli hayvan oranları %1.5 ve negatif hayvan oranı ise %97 olarak hesaplandı. Sonuçlar Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Kırklareli yöresi subklinik pTB seroprevalansı

Table 1. Kırklareli regional subclinical pTB seroprevalence

İlçe	(n) sayısı	(+)	(?)	(-)
Pehlivanköy	43	-	-	43
Pınarhisar	50	2	1	47
Merkez	84	1	1	82
Vize	45	1	2	42
Babaeski	60	-	-	60
Lüleburgaz	50	-	1	49
Kofçaz	40	1	1	38
Demirköy	28	1	-	27
TOTAL	400	6 (%1.5)	6 (%1.5)	388 (%97)

n; Hayvan sayısı, (+); pozitif olgu sayısı, (-); negatif olgu sayısı, (?) ; şüpheli olgu sayısı

n; Number of animals, (+); positive cases, (-); negative number of cases, (?); number of suspicious cases

TARTIŞMA VE SONUÇ

Paratüberküloz ve neden olduğu verim kayıpları ve yanı sıra sağlık açısından bu hastalığın sahip olduğu zoonotik potansiyel bilinmesine rağmen ülkemizde bu hastalığın yaygınlığı üzerine yürütülmüş genel ve bölgesel bilimsel araştırma sayıları sınırlıdır (Vural ve Atala 1988, Çetinkaya ve ark. 1999, İkiz ve ark. 2005, Civelek ve ark. 2009, Öztürk ve ark. 2010, Makav ve Gökçe 2013, Yıldırım ve Civelek 2013).

Sunulan çalışmada yoğun olarak süt sığırları bakım ve beslemesi yapılan Kırklareli yöresinde subklinik paratüberkülozun prevalansı araştırılmış ve çalışmamızda, hedef popülasyon olarak iki yaş üstü süt sığırları seçilmiştir. MAP güçlü bir hücre içi patojen olup, makrofaj hücreleri içerisinde uzun süre canlı kalabilmektedir. Enfeksiyonun gelişmesiyle birlikte kandaki antikör seviyesi artar. Enfeksiyonun ilerlemesi uzun zaman aldığından dolayı iki yaşın altındaki sığırlarda etken teşhisi zordur. Bu sebeple teşhis için özellikle kan

serumunun kullanıldığı çalışmalarda, iki yaştan daha küçük sığırlar materyal olarak tercih edilmemektedir. Yapılan bazı çalışmalarda bu yaştaki hayvanlarda ELISA testinin spesifitesi ve sensitivitesinin düşük olduğu ortaya konmuştur. İki yaşın altındaki sığırlarda pTB seroprevalansının değerlendirildiği bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar bu durumu desteklemektedir (Çetinkaya ve ark. 2000, Nielsen ve Toft 2009, Diequez ve ark. 2009, Öztürk ve ark. 2010).

Başlıca dışkı ve süt ile yayılım gösteren MAP subklinik dönemdeki hayvanlardan sağlıklı hayvanlara bulaşma eğilimindedir (Moghadam ve ark. 2010). Yanı sıra enfeksiyon doğumdan hemen sonra ve neonatal dönemde de bulaşabilir. Bu dönem buzağuların enfeksiyona karşı en duyarlı oldukları zaman dilimidir. Kontamine meme başı, süt ve kolostrum etkenin bulaşmasında başlıca rol oynar (Çetinkaya ve ark. 1997, Çetinkaya ve ark. 2000). Bu nedenle paratüberkülozun seroprevalansının subklinik dönemde belirlenmesi sürü yönetimi ve sağlığı açısından son derece önemlidir (Nielsen ve Toft 2009, Öztürk ve ark. 2010, Yıldırım ve Civelek 2013).

Trakya bölgesinde pTB prevalansı ile ilişkili bugüne kadar yürütülmüş iki farklı araştırma raporuna rastlanmıştır. İkiz ve ark. (2005) iki yaş ve üzeri sığırlardan rastgele örnekleme yöntemi ile seçilmiş 96 dışkı örneğini Outher PCR yöntemi ile taramış ve Trakya bölgesinde paratüberküloz etkenine rastlanmadığını rapor etmişlerdir. Bu çalışmada dışkı örneklerinin Trakya bölgesindeki farklı çiftliklerden toplandığı rapor edilmiş olmakla birlikte, kesin coğrafi bildirim (il, ilçe vb.) yapılmamıştır. Özpınar ve ark. (2015) ise araştırmalarını Edirne ili Keşan ilçesi köylerinde yürütmüşler ve çalışmalarında, 30 süt işletmesinde iki yaş ve üzeri sığırlardan elde edilen 270 dışkı örneğini ve bu köylerdeki süt tanklarından toplanan 45 süt örneğini değerlendirmişlerdir. İlgili çalışmada alınan örneklerde MAP genomuna rastlanmadığını araştırmacılar tarafından bildirmektedir. Tarafımızca sunulan bu çalışmada ise; Kırklareli Merkez ilçe dahil olmak üzere, sekiz farklı ilçede 23 farklı çiftlikten randomize olarak seçilmiş 400 süt sığırlarından serum örnekleri toplanmış ve ELISA yöntemi ile subklinik pTB varlığı yönünden analiz edilmiştir. Sunulan bu çalışmada, Kırklareli yöresi süt sığırlarında subklinik paratüberkülozun seroprevalansı %1.5 olarak belirlendi. Bu sonuca ilaveten; total değerlendirmede altı hayvan şüpheli (%1.5) ve 388 hayvan ise negatif (%97) olarak değerlendirildi.

Yapılan çalışmalarda çiftlik prevalansına yeterli kadar önem verilmediği görülmektedir. Bir işletmede tek bir hayvanda bile etkenin tespit

KAYNAKLAR

edilmiş olması bulaş riskini oldukça arttırmaktadır. Bu çerçevede Öztürk ve ark. (2010) Burdur yöresinde yaptıkları bir çalışmada hastalığın çiftlik prevalansını %58 olarak rapor etmişlerdir. Makav ve Gökçe (2013) ise Kars yöresinde yürüttükleri araştırmada çiftlik prevalansını %41.6 olarak ortaya koymuşlardır. Bu verilere göre bir genelleme yapılırsa, değerlendirilme yapılan bireysel işletmelerin yaklaşık yarısında paratüberkülozun tespit edildiği rahatlıkla söylenebilir. Avrupa ülkelerinde yapılan araştırmalarda ise bu hastalığın çiftlik yaygınlığı %0 ila 75 arasında bildirilmektedir (Diequez ve ark. 2009, Nielsen ve Toft 2009, Pozzato ve ark. 2011). Paratüberkülozun prevalans artışının çiftlikteki hayvan sayısı ile doğru orantılı olduğu da bazı araştırmacılar tarafından ileri sürülmektedir (Nielsen 2008, Öztürk ve ark. 2010, Pozzato ve ark. 2011). Sunulan bu araştırmada toplam 23 farklı çiftlikten örnekleme yapılmış olup, 4 çiftlikte birer hayvanda ve bir çiftlikte ise iki hayvanda etken tespit edilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bu veriler sonucunda, sadece pozitif sonuç veren hayvanlar bazında, Kırklareli bölgesi için çiftlik prevalansı %21.74 olarak ortaya konmuştur.

Trakya aşı tampon bölgesi olması nedeniyle ülkemiz hayvancılığı açısından stratejik bir öneme sahiptir. Türkiye genelinde daha önce rapor edilmiş prevalans araştırmaları ile karşılaştırıldığında, bu çalışmada elde edilen sonuçlar; Kırklareli yöresinde seropozitif hayvan sayısının (%1.5) oldukça düşük olduğunu ortaya koymaktadır. Bununla birlikte; hastalığın yaygınlığının düşük olması paratüberkülozun bu yörede hayvancılık açısından olası bir tehdit oluşturduğu gerçeğini değiştirmemektedir. Hastalıktan arı çıkan ilçelerin korunması ve seropozitif bölgelerin hastalıktan elimine edilmesi adına çalışmaların yapılması insan sağlığı, ülke ekonomisi ve süt sığırcılığının kalitesi açısından önem arz eder.

Subklinik hasta hayvanların tespiti, hastalığı sağlıklı hayvanlara bulaştırma eğiliminden dolayı önemlidir. Etkenin pastörizasyona karşı direnci ve zoonotik potansiyeli göz önünde bulundurulduğunda (Chiodini ve Her-Taylor 1993, Grant ve ark. 1996) subklinik paratüberkülozun halk sağlığı açısından da önem arz ettiği söylenebilir. Sunulan bu çalışma sonuçları, subklinik paratüberkülozun ülke ekonomisi ve insan sağlığı açısından neden olabileceği zararların ortaya konmasına yönelik ulusal düzeyde, çok fazla işletme ve hayvan materyalinin değerlendirileceği, kapsamlı bir çalışmanın gerekliliğine vurgu yapmaktadır.

- Alibaşoğlu M, Demirer F, Yücel N.** Paratüberkülozda Alerjik Reaksiyonların Patolojik Bulgularla Uygunluk Derecesi Üzerine Araştırma. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.* 1969; 16:236-256.
- Andrews AH.** *Bovine Medicine: Blackwell Scientific Publication London.* 1992.
- Atala N, Akcay E.** Türkiye genelinde sığır paratüberkülozu prevalansının ELISA ile araştırılması, *Etilik Vet Mikrobiyol Derg.* 2001; 12:39-48.
- Baumgartner W, Khol JL.** Paratuberculosis (johne disease) in Ruminants ongoing story. *Slow vet res.* 2006; 43:5-10.
- Berberoğlu M, Civelek T.** Seroprevalence of Subclinical Paratuberculosis in Dairy Cattle in Manisa Region of Turkey. *Kocatepe Vet J.* 2016; 9(3):194-196.
- Chiodini RJ, Hermon-Taylor J.** The thermal resistance of Mycobacterium paratuberculosis in raw milk under conditions simulating pasteurization. *J Vet Diagn Invest.* 1993; 5:629-631.
- Civelek T, Celik HA, Ozenc E, Avcı G, Kav K, Cıngı CC, Yılmaz O.** Effects of PCR-confirmed subclinical paratuberculosis on retinol and β -carotene levels in dairy cattle. *Arch Med Vet.* 2009; 41:281-284.
- Collins MT, Socket DC, Goodger WJ.** Herd prevalence and geographic distribution of, and risk factors for bovine paratuberculosis in Wisconsin. *J Am VetMed Assoc.* 1994; 204:636-41.
- Çetinkaya B, Erdogan HM, Morgan KL.** Risk factors for Bovine Paratuberculosis. II. The multiple analysis of risk factors for Bovine Paratuberculosis. *Turk J Vet Anim Sci.* 1997; 21:303-306.
- Çetinkaya B, Ergen K, Harbour DA, Morgan KL.** An abattoir-based study of the prevalence of subclinical Johnes disease in adult cattle in south west England. *Epidemiol. Infect.* 1999; 116:373-379.
- Çetinkaya B, Muz A, Eertas HB, Ongor H, Sezen İY, Gulcu HB.** Süt ineklerinde Paratüberküloz prevalansının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile saptanması. *Turk J Vet Anim Sci,* 2000; 24:371-379.
- Diequez FJ, Gonzales AM, Menendez S, Vilar MJ, Sanjuan ML, Yus E, Arnaiz I.** Evaluation of four commercial serum ELISA for detection of Mycobacterium

- avium subsp. paratuberculosis infection in dairy cows. *Vet J.* 2009; 180:231-235.
- Grant IR, Ball HJ, Negl SD, Rowe MT.** Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cows milk at pasteurization temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996; 62:631- 636.
- Hacker U, Huttner K, Konoe M.** Untersuchungen zur serologischen Prävalenz und zu Risikofaktoren der Paratuberkulose in Milchviehbetrieben in Mecklenburg Vorpommern. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr.* 2004; 117:140-144.
- Jakobsen MB, Alban L, Nielsen SS.** A cross-sectional study of paratuberculosis in 1155 Danish dairy cows. *Prev Vet Med.* 2000; 46:15-27.
- Jubb TF, Sergeant ES, Callinan AP, Galvin J.** Estimate of the sensitivity of an ELISA used to detect johnes's disease in Victorian dairy cattle herds. *Aust Vet j.* 2004; 82:569-573.
- Kalis CHJ, Hesselink JW, Barkema HW.** Comparison of culture of individual and strategically pooled bovine faecal samples for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. In: Manning EJB, Collins MT, eds. Proceedings of the 6th International Colloquium on Paratuberculosis. pp 344-8. Madison, Wisconsin. 1999.
- Makav M, Gökçe E.** Kars Yöresi Sığırlarında Subklinik Paratüberkülozun Seroprevalansı. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 2013; 19(5):913-916.
- Moghadam MT, Sarv S, Moosakhani F, Badue A.** Detection of *Mycobacterium avium* Subspecies paratuberculosis in Milk and faecal Samples in Dairy Cattle by PCR and Nested-PCR. *Journal of Animal Veterinary Avances.* 2010; 9(24):3055-3061.
- Nakase H, Nishio A, Tamaki H.** Specific antibodies against recominant protein of insertion element 900 of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in Japanese patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2006; 12:62-69.
- Nielsen SS.** Transitions in diagnostic tests used for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Vet Microbiol.* 2008; 132:274-282.
- Nielsen SS, Toft NA.** Reivew of prevalence of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev. Vet Med.* 2009; 88:1.14.
- Osterstock JB, Sinha S, Seabury CM, Cohen ND.** Effect of classifying disease states in genetic association studies for paratuberculosis. *Prev Vet Med.* 2010; 95:41-49.
- Öztürk D, Pehlivanoglu F, Tok AA, Gunlu S, Guldali Y, Turutoglu H.** Seroprevalence of paratuberculosis in the Burdur province (Turkey), in dairy cattle using the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Israel J Vet Med,* 2010; 65:53-57.
- Özpinar H, Tekiner İH, Karaman O, Kurt Y.** Investigation of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (MAP) in Fecal and Bulk Milk Samples from Dairy Farms in Thrace Region of Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2015; 21(2):247-252.
- Pickup RW, Rhodes G, Arnott S.** *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in the catchment aera and water of the river Taff in 11. South Wales, United Kingdom, and its potential relationship to clustering of Crohn's disease in the city of Cardiff. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 71:2130-2139.
- Pozzato N, Capello K, Comin A, Toft N, Nielsen SS, Vicenzoni G, Arrigoni N.** Prevalence of paratuberculosis infection in dairy cattle in Northern Italy. *Prev Vet Med.* 2011; 102:83-86.
- Van Leeuwen, JA, Keefe GP, Tremblay R.** Seroprevalence of infection with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, bovine leukemia virus and bovine viral diarrhoea virus in Maritime Canada dairy cattle. *Can Vet J.* 2001; 42:193-8.
- Vural B, Atala N.** Serological study on bovine paratuberculosis in central Anatolia using the microcomplement fixation and tube complement fixation tests. *Etlik Vet. Microbiol Derg.* 1988; 6:87-97.
- Yıldırım, D, Civelek T.** Prevalence of subclinical paratuberculosis in dairy cattle in Uşak Region. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2013; 19(1):121-126.

Endosülfan ve C Vitamini Uygulamalarının Erkek Yeni Zellanda Tavşanları Üzerindeki Etkisi

Özlem YILDIZ GÜLAY¹, Tülay BÜYÜKOĞLU², Fatma Şefika HATİPOĞLU^{1*},
Mehmet Şükrü GÜLAY¹

¹Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı

²Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı

*Corresponding author e-mail: offermann.sefika@googlemail.com

ÖZ

Çalışmamızda endosülfan uygulaması yapılan erkek Yeni Zellanda tavşanlarında C vitamini (VitC) ilavesinin bazı kan ve biyokimyasal parametreler ile oksidan-antioksidan denge üzerine düzeltici etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, yaşları 6 ile 8 ay arasında değişen 24 tavşan, her grupta 6 tavşan olacak şekilde, rastgele 4 çalışma grubuna ayrıldı. Kontrol grubundaki tavşanlara (TRT-I) mısır yağı verildi. İkinci grupta bulunan tavşanlara (TRT-II) günlük 1 mg/kg endosülfan mısır yağında eritilerek verildi. Üçüncü gruptaki tavşanlara 20 mg/kg dozunda VitC gün aşırı olarak uygulandı (TRT-III). Son gruptaki tavşanlara (TRT-IV) aynı oranlarda endosülfan ve VitC verildi. Oral yolla yapılan bu uygulamalar 6 hafta boyunca devam etti. Çalışmamızda toplam eritrosit ve trombosit, hemoglobin, hematokrit, ve lökosit değerleri yönünden gruplar arasında fark gözlenmezken, toplam lökosit sayılarında anlamlı bir fark bulundu. Ayrıca serum glukoz, alanin aminotransferaz (ALT), malondialdehit (MDA), glukoz 6 fosfat dehidrojenaz (G6PD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve eritrosit katalaz (CAT) aktivitelerinde de farklılık tespit edilmedi. TRT-III grubunda serum VitC seviyesi yükselirken, TRT-II grubunda serum alkalin fosfat (ALP) ve aspartat aminotransferaz (AST) seviyeleri arttı. Bununla birlikte VitC uygulamasının TRT-IV grubundaki tavşanlarda ALP ve AST seviyelerini TRT-II grubuna göre azalttığı gözlemlendi. Elde edilen bulgulara göre, VitC uygulamasının endosülfanın bazı zararlı etkilerine karşı erkek Yeni Zellanda tavşanlarında koruyucu olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: kan parametreleri, biyokimyasal parametreler, oksidan-antioksidan denge, endosülfan toksikasyonu, insektisit kullanımı, Vitamin C

Effects of Vitamin C on Male New Zealand White Rabbits Exposed to Endosulfan

ABSTRACT

The present study evaluated the protective effect of oral Vitamin C (VitC) against changes in hematological and biochemical parameters, and oxidant-antioxidant status in male New Zealand White rabbits treated with endosulfan. Total of 24 rabbits (6 to 8 years old) were randomly divided into 4 treatment groups (n=6). Rabbits in the control group (TRT-I) received corn oil for 6 weeks. Rabbits in the second group (TRT-II) received endosulfan (1 mg/kg bw per day) in corn oil. Rabbits in the third group (TRT-III) received corn oil daily and VitC (20 mg/kg bw) every other day for 6 weeks. Rabbits in the last group (TRT-IV) received the same amounts of endosulfan and VitC. All treatments were administered by oral route. Although total erythrocyte, trombocyte, hemoglobin and percent hematocrit, lymphocyte, granulocyte and monocyte did not differ among the treatment groups, total leukocyte numbers differed due to treatment. The serum glucose, alanine aminotransferase (ALT), malondialdehyde (MDA), glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PD), glutathion peroxidase (GPx), and erythrocyte catalase (CAT) in treatment groups were similar. However, serum VitC levels were elevated for rabbits in TRT-II group. In addition, serum alkaline phosphatase (ALP) and aspartate aminotransferase (AST) levels increased in the TRT-II group, whereas VitC application decreased ALP and AST levels in the TRT-IV group when compared to the TRT-II group. Thus, results suggested beneficial influences of VitC in neutralizing some harmful effects of endosulfan in male New Zealand White rabbits.

Keywords: blood parameters, biochemical parameters, oxidant-antioxidant status, endosulfan toxication, insecticide use, Vitamin C

To cite this article: Gülay Yıldız Ö. Büyükoğlu T. Hatipoğlu F. Ş. Gülay M. Ş. Endosülfan ve C Vitamini Uygulamalarının Erkek Yeni Zellanda Tavşanları Üzerindeki Etkisi. *Kocatepe Vet J.* (2018) 11(2): 165-172.

GİRİŞ

Endosülfan tarım ürünleri yetiştiriciliğinde bitkileri zararlılardan korumak için dünya çapında ve Türkiye’de de sıkça kullanılan organik klorlu bir insektisitlerdir. Sebze ve meyve zararlılarını kontrol altına almakta kullanılan endosülfan (6,7,8,9,10,10 – hexachloro - 1,5,5a,6,9,9a – hexahydro - 6,9 – methano -2,4,3– benzodioxathiepin – 3 - oxide) geniş spektrumlu, cycloiene grubuna ait organoklorlu pestisitlerden birisidir (Zhang ve ark, 2017). Ziraî mücadele ilacı olarak bitkilerdeki insektisitlere karşı oldukça etkili bir ilaç olmasına rağmen, bitkilerde ve sulara yüksek konsantrasyonlarda birikebilmekte (Menezes ve ark, 2017; Simonich ve Hites 1995; Xu ve ark., 2016), insan ve hayvanlarda akut toksisiteye de sebep olabilmektedir (Sharma ve ark, 2017). Endosülfanın LD50 dozu uygulama yoluna, türe, içinde bulunduğu maddenin türüne ve hayvanın cinsiyetine göre değişir. Oral LD50 dozu ratlar için 9.6 -160 mg/kg, fareler için 13.5 - 35 mg/kg arasında bulunmuştur (Bremer ve Leist 1998).

Akut endosülfan intoksikasyonunun insanlarda metabolik asidoza, yüksek anyonik duruma, hiperglisemiye ve trombositlerde azalmaya neden olduğu anlaşılmıştır (Blanco ve ark. 1992). Endosülfanın, eritrosit sayısını azalttığı, eritrosit glutatyon redüktaz (GR) düzeyi ve aktivitesini, kan hemoglobün konsantrasyonu ve MCV’ü düşürdüğü rapor edilmiştir (Naqvi ve Vaishnavi 1993). Yine aynı çalışmada glukoz 6–fosfataz aktivitesi ve kan glukoz düzeyinde artma, plazma Ca düzeyinde ve Na, K, Mg ATPaz düzeylerinde azalma olduğu gözlemlenmiştir. Endosülfanın önemli sitotoksik etkiye sahip olduğu, endosülfana maruz kalan fagositik hücrelerin metabolik aktiviteleri ile migrasyonlarını ve lenfositlerin mitojenik aktivasyonlarını önemli ölçüde baskıladığı bildirilmiştir (Pistl ve ark. 2003). Bir başka çalışmada da 0,001 g/ ml (1 ppb) endosülfanın insan eritrosit membran yapısını bozduğu tesbit edilmiş olup, 1g/ml (1ppm) endosülfan konsantrasyonunda hücrelerin belirgin şekilde zarar gördükleri rapor edilmiştir (Daniel ve ark. 1986).

Endosülfan etkisine maruz bırakılan balıklarda da katalaz (CAT) aktivitelerinin endosülfanın düşük dozlarında arttığı, yüksek dozlarında ise azaldığı saptanmıştır (Dorval ve ark. 2003). Glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesi önemli şekilde azalırken, glutatyon transferaz (GST) aktivitesi artmıştır. Adrenokortikal steroidogenik hücrelerin sekretorik cevaplarının azalması dolayısıyla GPx aktivitesi için önemli kofaktör olan glukokortikoid düzeylerinin düştüğü, oksidatif stres yolunda iş gören enzimlerin aktivitelerinin de değiştiği saptanmıştır. Yine aynı çalışmada lipid

hidroperoksit düzeylerinin yükselmesi, endosülfanla oluşturulan oksidatif stresin bir bulgusu olarak değerlendirilmiştir (Dorval ve ark. 2003).

Vitamin C (VitC), meyve ve sebzelerde doğal olarak üretilen bir antioksidandır. Organik gübrelerle yetiştirilen fakat pestisit kullanılmayan ürünlerde yüksek düzeyde VitC ölçülmüş ve pestisitten fakir ürünlerin daha fazla antioksidan içerdikleri tesbit edilmiştir. VitC, memeli hayvanlarda bağırsaklardan emilen, canlı vücudunda plazmada ve hücreler içerisinde bulunan primer bir antioksidan olup plazma membranları ile etkileşim halindedir ve α tokoferolün geri dönüşümünü sağlayarak membran lipidlerini peroksidasyondan korur (May 1999). VitC, belirli enzimlerin redükte formda tutulmasını sağlayarak dokuları zararlı oksidatif ürünlerden korumaktadır (Padh 1990).

Subakut endosülfan zehirlenmesi ile ilgili çalışmaların çoğu rat ve fareler üzerine olup, tavşanlarda oral endosülfan alımının etkisi üzerine sınırlı bilgiler mevcuttur. Endosülfanın oral yolla verilmesinin sebebi, tehlikeli bölgelerde yaşayan insanların genellikle endosülfan etkisine bu şekilde maruz kalmasından dolayıdır. Bu çalışmanın amacı, endosülfanın bazı hematolojik ve biyokimyasal parametreler, ve oksidan-antioksidan denge üzerine etkisini ve normal değerlerinden sapan bulguların VitC ile düzeltilebilirliğinin araştırılmasıdır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Akdeniz Üniversitesi Etik Komitesi tarafından onaylanan bu çalışmada (2004.01.0108.001) Pera Tavşan Firmasından (Yeşilyurt-ANTALYA) tedarik edilen 6–8 aylık ve ağırlıkları 2,8–3,7 kg arasında değişen 24 adet erkek Yeni Zellanda tavşanı kullanıldı. Tavşanlar galvanize kafeslerde bireysel olarak tutuldular ve çalışmaya başlamadan önce 1 ay boyunca laboratuvar şartlarına (10 saat aydınlık 14 saat karanlık ve 24±5 °C) alıştırdılar. Çalışma süresince tavşanların ağırlıkları haftalık olarak tartıldı ve ağırlıklarına göre doz ayarlaması yapıldı. Su ve yem ad libitum olarak verildi. Tavşanlar standart ticari tavşan yemi (Burdur Ekinciler yem fabrikasının, % 88 kuru madde, %9 kül, %16 ham protein, %15 ham sellüloz ve 2600 kcal/kg metabolize olabilir enerji içeren) ile beslendiler.

Çalışma Grupları

Erkek tavşanlarda, oral subakut endosülfan toksisitesi oluşturmak amacıyla uygulanacak dozun belirlenmesi için, bu araştırmaya başlamadan önce ön denemeler yapıldı. Ön denemelerde endosülfanın günlük 1.50 mg/kg canlı ağırlık oral doz uygulamalarının, endosülfan toksisitesine bağlı olarak, ölüm ile sonuçlandığı gözlemlendi

(Hatipoglu ve ark, 2008). Bu yüzden en yüksek metabolik etki ve en düşük ölüm oranını elde etmek için endosülfanın oral dozu günlük 1,0 mg/kg canlı ağırlık olarak belirlendi. Buna rağmen, araştırmamız sırasında, TRT-II ve IV gruplarından birer tavşanda endosülfan zehirlenmesine bağlı ölüm gözlemlendi. Çalışmanın ilk 4 haftası alıştırma dönemi, sonraki 6 haftası ise deneysel çalışma dönemi olarak planlandı. Tavşanlar her grupta 6 tavşan olacak şekilde 4 gruba ayrıldılar. Gruplardaki çalışma protokolu aşağıdaki gibidir (n = 6).

TRT-I: Kontrol grubu: günlük mısır yağı oral (3 kg canlı ağırlık için 1 mL mısır yağı);

TRT-II: Endosülfan grubu: günlük endosülfan (1 mg/kg canlı ağırlık) mısır yağı içerisinde (1 mL mısır yağı 3 mg endosülfan);

TRT-III: Vitamin C grubu: günlük mısır yağı oral (3 kg canlı ağırlık için 1 mL mısır yağı) + VitC, iki günde bir (20 mg/kg canlı ağırlık) çeşme suyu içerisinde (1 mL çeşme suyu 20 mg VitC);

TRT-IV: Endosülfan ve Vitamin C grubu: günlük endosülfan (1 mg/kg canlı ağırlık) mısır yağı içinde (1 mL mısır yağı 3 mg endosülfan) + VitC, iki günde bir (20 mg/kg canlı ağırlık) çeşme suyu içerisinde (1 mL çeşme suyu 20 mg VitC).

Tavşanlara yaklaşık 3 kg canlı ağırlık için 1 ml mısır yağı verildi. Endosülfan ve VitC'nin dozu haftalık canlı ağırlığa göre ayarlandı. Her tavşan için hesaplanan uygun doz, şırıngaya tespit edilmiş olan plastik gavaj ile özafaringeal bölgeye uygulandı. Denemenin son günü 12 saat aç bırakılan tavşanların kulak arterlerinden kan örnekleri alınarak hematolojik ve biyokimyasal analizler için kullanıldı.

Hematolojik ve Biyokimyasal Parametreler

Hematolojik parametreler (eritrosit sayısı, hematokrit, lökosit sayısı ve trombositler) tam otomatik hematolojik analiz cihazında (Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica GmbH, Germany) ölçüldü. Eritrositlerin sedimentasyon hızları rutin Westergren metoduyla 1 saatlik çökme seviyelerinin okunması suretiyle belirlendi (Jou ve ark, 2011). Eritrositlerin fragiliteleri, spektrofotometrik olarak % 50 hemolizin görüldüğü tuz çözeltileri ile saptanarak takip edildi (Bucher 1988). Özetle, içlerinde NaCl yoğunlukları % 0,85 ile %0,30 arasında değişen 12 tüp hazırlandı (toplam hacim 1 ml). Onüçüncü tüpe ise distile su (%0,0 NaCl) ilave edildi. Her tüpe 0,1 ml kan eklendi. İçerik hafifçe karıştırıldı. Tüpler 26-27 °C'de 20 dakika bekletildikten sonra 1500 g'de 20 dakika santrifüj edildi. Tüplerdeki süpernatantlar küvete aktarıldı. Spektrofotometre aracılığıyla küvetteki hemoglobün miktarı 540 nm'de okundu. Hemoliz yüzdesi test tüpünden elde edilen

okumanın %0,0'lık NaCl tüpündeki okumasına bölünerek ve daha sonra 100 ile çarpılarak hesaplandı (Shimadzu Recording Spectrophotometer UV-1601, Japan). Plazma C vitamini fosfotungstat metodu ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Deneyin prensibi askorbik asidin alkali ortamda fosfotungstik asit ile okside edilmesi ve fosfotungstik asidi indirgemesi sonucu mavi rengin oluşumu esasına dayanır. Meydana gelen mavi renkli çözelti daha sonra spektrofotometre aracılığıyla 690 nm dalga boyunda absorbanı ölçüldü (Kyaw 1978).

Plazma glukozu, primer aromatik bir amin olan o-toluidin'in sıcak glasiyal asetik asit içinde glukozun terminal aldehit grubuyla mavi-yeşil bir renk oluşturmak üzere reaksiyona girmesi prensibine dayalı o-toluidin metoduna göre (Feteris, 1965) belirlendi. Eritrosit CAT aktivitesi; Aebi'nin (1984) tanımladığı metoda göre kısaca serumun, hidrojen peroksit içeren fosfat tamponuyla (30mM, pH 7.0) reaksiyonu sonucu 240nm'deki absorbanındaki azalmanın ölçülmesiyle belirlendi. GPx, Beutler'in (1975) metoduna göre ölçüldü. Bu metoda göre, redükte glutatyon (GSH) t-butil hidroperoksit varlığında GPx aktivitesiyle okside glutatyon (GSSG) dönüşür ve GSSG glutatyon redüktaz (GR) ve NADPH yardımıyla tekrar GSH'ye indirgenir ve NADP⁺ meydana gelir. GPx aktivitesi, NADPH'in NADP⁺'ye yükseltgenmesi sırasındaki absorban farkının 340 nm'de okunmasıyla belirlenir. Plazma Malondialdehid (MDA) düzeyi, MDA ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyona dayalı spektrofotometrik metotla (Satoh, 1978) ve G6PD enzim aktivitesindeki değişimler, spektrofotometrede 37 °C'ta Beutler'in (1983) metoduna göre tespit edildi. Bu metod, substrat glukoz 6-fosfat ve kofaktör NADP'nin G6PD tarafından NADPH'a indirgenmesi esasına dayanır. G6PD aktivitesine bağlı olarak artan NADPH'ın 340 nm'deki absorban değişimi ölçüldü. Enzim aktivitesi, IU.gHb⁻¹.dak⁻¹ (37°C, pH 8.0) olarak açıklandı (IU: 37°C'de dakikada 1mmol NADP⁺ yi indirgeyen enzim miktarıdır). Diğer biyokimyasal parametreler (ALT, AST ve ALP) ise otoanalizör (Roche Modular PP otoanalizör, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) ile ölçüldü.

İstatistiksel Analiz

Bütün değerler ortalama değerler olarak verildi. İstatistiksel değerlendirme için SAS (PROC GLM prosedürü) istatistik programından faydalandı. Gruplar arası farklılığı karşılaştırmak için "Dunnett post hoc" analizi yapıldı. Gruplar arası farklılık P< 0,05 olduğunda önemli olarak kabul edildi.

BULGULAR

TRT-II ve TRT-IV gruplarından birer tavşan, tipik endosülfan toksisitesi (hipereksitabilite, dispne, hiperpne, tremor ve tonik-klonik konvülsionlar, kafes duvarlarına çarpma, depresyon, göğüs üzerine yatarak ön ayakların ekstensiyonu) göstererek öldüğü için çalışmadan çıkarıldı. Kontrol ve çalışma grupları arasında ise canlı ağırlık bakımından farklılık görülmedi (Tablo 1).

Hematolojik parametreler arasında sadece lökosit sayısının ve eritrosit sedimentasyon hızının (ESR), biyokimyasal parametrelerden ise VitC, ALP ve AST değerlerinin etkilendiği görülmektedir (Tablo 1 ve 2). Lipit peroksidasyon belirteci olan serum MDA düzeyi ve serum G6PD, GPx enzim aktiviteleri ile eritrosit CAT aktivitesi de gruplar arasında istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır (Tablo 2). Benzer bir şekilde, eritrosit sayısında, hemoglobün ve hematokrit değerlerinde, lenfosit, granülosit, monosit yüzde oranlarında ve trombosit sayısında önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Tablo 1).

Lökosit değerleri TRT-I, TRT-II ve TRT-III gruplarında birbirlerinden farklı değilken, TRT-IV grubunda bulunan tavşanlarda lökosit değerleri TRT-I ve II gruplarına göre bir düşüş göstermiştir. Eritrosit sedimentasyon hızının endosülfanın etkisi ile arttığı (TRT-II), TRT-IV grubundaki tavşanlarda ise VitC ilavesinin sedimentasyon hızını TRT-I grubundaki seviyelere düşürdüğü müşahade edilmiştir (Tablo 1).

TRT-III grubunda ise lökosit değerlerinde bir azalma gözlenmiş olmakla birlikte, bu azalma kontrol grubuna göre önemli bulunmamıştır. VitC

uygulanmasının, lökositlerin sayısındaki bu düşüşü engel olamadığı görülmektedir (Tablo 1). Serum VitC düzeyinde ise, TRT-IV grubunda, TRT-I ve II gruplarına göre fark gözlenmezken, TRT-III grubuyla karşılaştırıldığında azalma saptanmıştır. TRT-II grubundaki serum VitC düzeyleri, TRT-I ve III gruplarına göre önemli ölçüde azalırken, TRT-III grubunda diğer gruplardan daha yüksek serum VitC düzeyi tespit edilmiştir (Tablo 2).

Serum glukoz düzeyleri TRT-II grubunda TRT-I grubuna göre yükselmiş olmasına rağmen, bu yükselme istatistiksel önemde bulunmamıştır. TRT-III grubunda ise serum glukoz düzeylerinde bir düşüş gözlenmiş ancak bu düşüş de TRT-I grubuna göre önemli bulunmamıştır (Tablo 2).

Serum ALT enzim aktivitesinde, gruplar arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir. Fakat, TRT-II grubunda serum ALP ve AST seviyelerinde diğer gruplara göre istatistiksel olarak önemli bir artış belirlenmiştir. Endosülfan ile birlikte yapılan VitC uygulamasının ise ALP ve AST seviyelerini TRT-I grubu düzeylerine düşürdüğü gözlenmiştir (Tablo 2).

TRT-I, II ve IV gruplarında % 0,55 NaCl konsantrasyonunda eritrositlerin % 50'sinin dayanıksız olduğu tesbit edilirken, VitC uygulanan grupta osmotik fragilite oranının aynı tuz konsantrasyonunda % 40'da kaldığı görüldü. Eritrositlerin %70-80'i, %0,50'lik NaCl konsantrasyonunda hemoliz olurken, VitC uygulanan grupta bu oranın %60'ta kaldığı gözlemlendi. Gruplar arasında istatistiksel bir önem olmamasına karşın, VitC uygulanan grupta eritrositlerin diğer gruplara nazaran daha dayanıklı olduğu gözlemlendi.

Tablo 1. Endosülfan ve C vitamini uygulanan erkek Yeni Zellanda Tavşanlarında vücut ağırlıkları ve hematolojik parametreler.

Table 1. Final body weights and hematological parameters of male New Zealand White rabbits treated with endosulfan and Vitamin C

	TRT-I (n=6)	TRT-II (n=5)	TRT-III (n=6)	TRT-IV (n=5)	P<
Canlı ağırlık (g)	3031,9±142,6	3156,7±156,2	3162,4±141,6	2980,7±154,2	NS
Eritrosit (x10 ⁶ /μl)	6,99±0,19	6,91±0,23	6,60±0,20	6,63±0,24	NS
Hb (g %)	13,45±0,81	12,76±0,46	13,07±0,39	13,56±0,45	NS
Htc (%)	40,65±0,81	38,00±0,96	37,39±0,82	38,96±0,96	NS
Lökosit (x 10 ³ /μl)	9,13±0,58 ^a	8,41±0,69 ^a	7,91±0,59 ^{ab}	6,27±0,70 ^b	0,04
Lenfosit (%)	39,97±2,41	37,82±2,85	35,82±2,42	41,20±2,86	NS
Granulosit (%)	52,46±2,78	49,26±3,31	52,59±2,80	45,90±3,30	NS
Monosit (%)	11,49±0,86	12,88±0,98	11,57±0,86	12,68±1,02	NS
Trombosit (x10 ³ /μl)	480,8±34,5	471,5±35,3	438,5±34,6	407,3±40,9	NS
ESR (mm/saat)	2,5±0,82 ^{ab}	4,33±0,89 ^a	1,14±0,83 ^b	2,99±1,05 ^{ab}	0,05

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistiksel farklılık vardır (p<0,05). NS= p>0,1.

TRT-I= Kontrol, TRT-II= 1mg/kg endosülfan, TRT-III=20 mg/kg vitamin C, TRT-IV= 1mg/kg endosülfan + 20 mg/kg vitamin C; ESR=Eritrosit sedimentasyon hızı.

Tablo 2. Endosülfan ve C vitamini uygulanan erkek Yeni Zellanda Tavşanlarında kan antioksidan enzimleri ve biyokimyasal parametreler.

Table 2. Blood antioxidant enzymes and biochemical parameters of male New Zealand White rabbits treated with endosulfan and Vitamin C.

	TRT-I (n=6)	TRT-II (n=5)	TRT-III (n=6)	TRT-IV (n=5)	P<
Glukoz (mg/dl)	139,9±7,69	148,6±7,79	121,8±7,37	128,2±8,56	NS
Vitamin C (mg/dl)	1,60±0,04 ^a	1,43±0,05 ^b	1,72±0,04 ^c	1,53±0,06 ^{ab}	0,01
MDA (nmol/ml)	1,73±0,14	1,51±0,14	1,77±0,12	1,44±0,15	NS
G6PD (U/gHb)	3,78±0,48	3,61±0,61	3,90±0,47	4,88±0,56	NS
GPX(U/gHb)	11,23±0,74	12,23±0,83	12,07±0,79	12,95±0,92	NS
ErKat (U/gHb)	23,17±1,24	24,13±1,29	25,99±1,15	22,97±1,43	NS
ALP (IU/l)	71,2±9,9 ^a	131,5±13,4 ^b	70,7±11,5 ^a	86,9±15,8 ^a	0,02
AST(IU/l)	26,7±4,1 ^a	41,3±5,3 ^b	23,6±3,8 ^a	30,4±4,9 ^a	0,03
ALT(IU/l)	41,6±4,3	47,0±5,6	46,5±1,15	49,5±5,8	NS

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistiksel farklılık vardır (p<0,05). NS=p>0,1.

TRT-I= Kontrol, TRT-II= 1mg/kg endosülfan, TRT-III=20 mg/kg vitamin C, TRT-IV= 1mg/kg endosülfan + 20 mg/kg vitamin C; MDA= Malonil dialdehid, G6PD= Glukoz 6 Fosfat Dehidrojenaz, GPX= Glutasyon peroksidaz, ErKat= Eritrosit Katalaz

TARTIŞMA

Endosülfan, Türkiye dahil bir çok ülkede tarımsal mücadelede kullanılan güçlü bir insektisittir. Dünya Sağlık Örgütü, endosülfanı orta şiddette zehirli olarak sınıflandırmasına rağmen, akut ölüm oluşturacak kadar şiddetli zehirlenmeye de sebep olabilmektedir (Xu ve ark. 2017).

Çalışmamızda, hematolojik parametreler arasında sadece lökosit sayısının etkilendiği görülmektedir. Lökosit değerleri TRT-I, II ve III gruplarında birbirlerinden farklı değilken, VitC'nin ES ile birlikte verildiği TRT-IV grubunda diğerlerinden farklı olmak üzere bir düşüş olmuştur. Endosülfan total lökosit sayısında azalmaya neden olmakla birlikte, sadece TRT-IV grubunda diğerlerine göre istatistiksel önem arz etmektedir. Çalışmamızda kullanmış olduğumuz VitC dozunun lökositlerin sayısındaki bu düşüşe engel olamadığı görülmektedir. Kanatlılarda yapılan bir çalışmada günlük 30 ppm dozunda verilen endosülfanın beyaz kan hücreleri üzerine etkili olmadığı bildirilmiştir (Singh ve ark. 2016). Ratsların kullanıldığı farklı bir çalışmada günlük ortalama alım dozunun 100 katı kadar olan (0,6 mg/kg) endosülfan uygulamalarında hiçbir parametrede değişiklik oluşmazken, doz 1000 (6,12 mg/kg) katına çıkarıldığında lökosit sayısında bir düşüşün olduğu bildirilmiştir (Akay ve ark. 1999). Endosülfanın bu etkisinin lökosit göçünü inhibe ederek, lökosit apoptozisini uyarak veya lökositler üzerindeki olası mutajenik ve genotoksik etkileri sebebiyle olabileceği belirtilmiştir (Akay ve ark. 1999; Kannan ve ark. 2000).

ESR, akut faz yanıtını değerlendirmede kullanılan parametrelerden biridir. Akut faz yanıtı ise doku hasarı varlığının belirlenmesi için kullanılacak iyi bir veridir. Doku hasarı geliştiğinde özellikle serum fibrinojen, serum amiloid A proteini ve C-reaktif protein miktarı artar (Gabay ve Kushner 1999). Ayrıca, serum karaciğer enzim seviyelerindeki azalmanın ESR'yi azalttığı, artışın ise ESR'de artışa sebep olduğu bildirilmiştir (Targer ve ark, 2008). Endosülfanın farklı dozlarda uygulandığı önceki çalışmamızda, tavşanlarda özellikle karaciğer ve böbreklerde doku hasarına yol açtığı gözlenmiştir (Hatipoglu ve ark, 2008). Ayrıca, çalışmamızdaki karaciğer enzimlerindeki artış da bu hasarı desteklemektedir. Çalışmamızda ESR değerleri TRT-II grubundaki tavşanlarda TRT-III grubundakilere göre yükselmesine rağmen, endosülfanla birlikte VitC verilen grupta (TRT-IV) ESR değerlerindeki artışın engellendiği gözlenmektedir. Bu durum, karaciğer enzimlerindeki değişime paralel olarak, VitC'nin endosülfanın oluşturduğu doku hasarı üzerine düzeltici etkisi olduğunu düşündürmektedir.

Daha önceki araştırmalarda da gözlendiği gibi (Naqvi ve Vaishnavi 1993; Narra ve ark. 2015; Kumar ve ark 2016) serum glukoz düzeyleri TRT-II grubunda TRT-I grubuna göre yükselmiş olmasına rağmen, bu yükselme istatistiksel önemde bulunmamıştır. TRT-III grubunda ise glukoz seviyelerinde düşme gözlenmiş, ancak bu da TRT-I grubuna göre önemli bulunmamıştır. Endosülfan uygulamalarıyla, muhtemelen karaciğer hasarına ve strese bağlı olarak meydana gelebilecek serum glukoz artışının, VitC uygulamaları ile düzeltilebileceği daha önce de bildirilmiştir (Narra ve ark. 2015). VitC uygulamalarının, antioksidan özelliğiyle karaciğer hasarını önleyici olabileceği ve

stresi azaltarak glikojen yıkımındaki olası artışı engelleyebileceği düşünülmektedir (Narra ve ark. 2015).

VitC düzeyi ise, TRT-IV grubunda TRT-I grubuna göre fark göstermezken, TRT-II grubunda önemli şekilde düşmüş, TRT-III grubunda ise muhtemelen VitC yüklemesine bağlı olarak yükselmiştir. Ancak, lökosit seviyelerinde gözlemlendiği gibi, TRT-IV grubundaki tavşanların serum ViC seviyelerindeki düşüşün, sadece VitC uygulanan TRT-III grubuyla kıyaslandığında, engellenemediği gözlenmiştir.

Çalışma gruplarındaki tavşanların canlı ağırlıklarında, eritrosit sayısında, hemoglobün, hematokrit, lenfosit, granülosit, monosit ve trombosit değerlerinde önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Tür farklılığı olmakla birlikte, Pal ve arkadaşlarının (2004) broyler tavuklarda yapmış olduğu çalışmada da benzer sonuçlar bildirilmiştir. Uygulanan endosülfan dozunun hematolojik parametreler üzerine, deneme süresi içerisinde etkisinin çok sınırlı kaldığı saptanmıştır. Endosülfan toksikasyonundan en fazla etkilenen organlar karaciğer ve böbreklerdir (Blanco-Coronado ve ark. 1992; Segasothy ve Pang 1992). Endosülfanın atılımı dışkı ve idrarla olduğundan birikim en fazla bu organlarda şekillenir. Serum ALT, AST ve ALP, karaciğer fonksiyonları hakkında bilgi veren önemli enzimlerdir. Karaciğer dokusunda bir dejenerasyon olduğunda, bu enzimlerin serum seviyelerinde bir artış gözlenmektedir (Henderson ve Moss 2005). Çalışmamızda endosülfan uygulamalarının erkek tavşanlarda ALP ve AST enzimlerinin serum seviyelerini artırdığı sonucuna varılmıştır. Daha önce yaptığımız çalışmada gözlemlediğimiz karaciğer dokusundaki hasar da bu bulguları desteklemektedir (Hatipoglu ve ark. 2008). Farelerde yapılan benzer bir çalışmada da endosülfanın karaciğer enzimlerini yükselttiği belirtilmiştir (Mansour ve ark. 2017). Bu enzimlerin yükselme derecesi hepatoselüler fonksiyon kaybı ile doğru orantılıdır. Endosülfanın oksidatif stresi artırdığı ve organlarda toksisiteye sebep olabileceği konusunda çalışmalar mevcuttur (Korkmaz ve ark. 2010; Daidoji ve ark. 2003). Bu durumun reaktif oksijen ürünlerinde ve serbest radikal seviyelerinde artışa sebep olarak, prooksidan ve antioksidan dengesini bozduğu ve karaciğer dokusunda harabiyete sebep olduğu ileri sürülmüştür (Videla 2009). Endosülfanın VitC ile beraber verildiği TRT-IV grubunda ise bu enzim seviyelerinin yükselmediği, bilakis kontrol düzeylerinde kaldığı gözlenmiştir. Kuvvetli bir antioksidan olan VitC bu etkisini reaktif oksijen türlerini (ROS) sistemden uzaklaştırarak, lipid peroksidasyonunu baskılayarak veya dolaylı yoldan antioksidan savunma sistemini koruyarak göstermiş olabilir.

Etki mekanizması ile ilgili in vitro çalışmalar; endosülfanın oksidatif fosforilasyona karışmadığını (Kannan ve Jain 2003), endojen antioksidanların ve karaciğer superoxide dismutaz (SOD) aktivitesinde azalma meydana getirdiğini (Bebe ve Panemangalore 2003), ve ROS'un ve dolayısıyla ortaya çıkan oksidatif stresin (Sohn ve ark. 2004) dokularda hasara yol açtığını (Rao ve ark. 2005) göstermiştir. Vitamin C'nin iyileştirici etkisi, pek çok metabolik yolda ortaya çıkan toksik etkili serbest oksijen radikallerini yakalamasına ve güçlü bir antioksidan olmasına atfedilmektedir (Dawson ve ark. 1992).

SONUÇ

Çalışmamızda uygulanan endosülfan dozlarının (1mg/kg canlı ağırlık, oral doz) hematolojik parametreler üzerine etkisinin sınırlı kaldığı gözlemlenmiştir. Endosülfan etkisiyle ortaya çıkan lökosit sayısındaki azalmanın, VitC uygulamaları ile engellenemediği görülmektedir. Ayrıca, uygulanan endosülfan dozunda, antioksidan enzim aktivitesinde ve lipid peroksidasyon (MDA) düzeylerinde de önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Buna rağmen, endosülfan toksikasyonunda karaciğer enzimlerinde (ALP ve AST) artış görülmüş ve Vit C'nin bu artışı normal seviyelerine düşürdüğü belirlenmiştir. Sonuç olarak, tavşanlarda subakut endosülfan toksikasyonunun, karaciğer enzimlerindeki düşüş göz önüne alındığında, VitC'nin hücre koruyucu özelliği dolayısı ile endosülfan intoksikasyonunda yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Yardımlarından dolayı Sayın Mehmet Uğur Özceylan'a, Sayın Bedri Başakın'a ve Data Medikale teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Aebi H.** Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121-126.
- Akay MT, Ozmen G, Elcuman EA.** Effects of combinations of endosulfan, dimethoate and carbaryl on immune and hematological parameters of rats. *Vet Hum Toxicol.* 1999; 41(5):296-9.
- Bebe FN, Panemangalore M.** Exposure to low doses of endosulfan and chlorpyrifos modifies endogenous antioxidants in tissues of rats. *J Environ Sci Health B.* 2003; 38: 349-363.
- Beutler E.** Glucose-6 Phosphate Dehydrogenase Deficiency. In: *The Metabolic Bases of the Inherited Disease*, Ed; Mc Graw-Hill

- Education - Europe, 8th Ed., Mc Graw-Hill Medical, New York, USA. 1983; pp. 1629-1653.
- Beutler E.** Red Cell Metabolism. In: A Manual of Biochemical Methods, Grune and Straton, New York, USA. 1975; pp.67-69.
- Blanco-Coronado JL, Repetto M, Ginestal RJ, Vicente JR, Yelamos F, Lardelli A.** Acute intoxication by endosulfan. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1992; 30(4): 575-583.
- Bremer JN, Leist KH.** Endosulfan (AE F002671, substance technical). Valuation of the acute oral and dermal toxicity. Hoechst document A59823, Frankfurt, Germany, 1998.
- Bucher U.** Labormethoden in der Haematologie. Verlag Hans Huber, Bern. 1988.
- Daidoji T, Inoue H, Kat S, Yokota H.** Glucuronidation and excretion of nonylphenol in perfused rat liver. *Drug Metabolism Disposal.* 2003; 31: 993-998.
- Daniel CS, Agarwal S, Agarwall SS.** Human red blood cell membrane damage by endosulfan. *Toxicol Lett.* 1986; 32 (1-2), 113-118.
- Dawson EB, Harris WA, Powell LC.** Relationship between ascorbic acid and male fertility. *World Rev Nutr Diet.* 1990; 62: 1–26.
- Dawson EB, Harris WA, Teter MC, Powell LC.** Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. *Fertil Steril.* 1992; 58: 1034–1039.
- Dorval J, Leblond VS, Hontela A.** Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vitro to endosulfan, an organochlorin pesticide. *Aquat Toxicol.* 2003; 63(3): 229-241.
- Feteris WA.** A serum glucose method without protein precipitation. *Am J Med Technol.* 1965; 31: 17-21.
- Gabay C, Kushner I.** Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New England J Med.* 1999; 340:448-454.
- Hatipoglu FS, Gulay MS, Balic A, Yildiz-Gulay O, Volkan S.** Subacute Oral Toxicity of Endosulfan in Male New Zealand White Rabbits. *Toxicol Mechanisms Methods.* 2008; 18: 705-710.
- Henderson AR, Moss DW.** Tietz fundamentals of clinical chemistry. Ed; Burtis CA, Ashwood ER, Lubbock, Texas, USA. 2005; 352-392.
- Jou J, Lewis S, Briggs C, Lee S, De La Salle B, McFadden S.** ICSH review of the measurement of the erythrocyte sedimentation rate. *Int J Lab Hematol.* 2011; , 33, 125-132.
- Kannan K., Holcombe RF, Jain SK, Alvarez-Hernandez X, Chervenak R, Wolf RE, Glass J.** Evidence for the induction of apoptosis by endosulfan in a human T-cell leukemic line. *Mol Cell Biochem.* 2000; 205: 53-66.
- Kannan K, Jain SK.** Oxygen radical generation and endosulfan toxicity in Jurkat T-cells. *Mol Cell Biochem.* 2003; 247: 1-7.
- Korkmaz A, Ahabab MA, Kolankaya D, Barlas N.** Influence of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced oxidative damages in liver of male rats. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48(10): 2865-2871.
- Kumar N, Ambasankar K, Krishnani KK, Gupta SK, Bhushan S, Minhas SP.** Acute toxicity, biochemical and histopathological responses of endosulfan in *Chanos chanos*. *Ecotoxicol Environ Safety.* 2016; 131: 79-88.
- Kyaw A.** A simple colorimetric method for ascorbic acid determination in blood plasma. *Clinica Chimica Acta.* 1978; 86(2):153-157
- Mansour S, Abdel-Mageed M, Mohamed K, Gad M, Gamet-Payrastre L.** Adverse Effects to Suckling Mice Following Indirect Exposure to a Pesticide Mixture and Ameliorative Effect of α -Tocopherol Coadministration. *J Basic Clin Health Sci.* 2017; 3: 71-78.
- May MJ.** Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane? *FASEB J.* 1999; 13: 995-1006.
- Menezes RG, Qadir TB, Moin A, Fatima H, Hussain SA, Madadin M, Pasha SB, Al Rubaish FA, Senthilkumaran S.** Endosulfan poisoning: An overview. *J Foren Legal Med.* 2017; 51: 27–33.
- Naqvi SM, Vaishnavi C.** Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan insecticide to nontarget animals *Comp Biochem Physiol C.* 1993; 105(3):347-361.
- Narra MR, Rajender K, Reddy RR, Rao JV, Begum G.** The role of vitamin C as antioxidant in protection of biochemical and haematological stress induced by chlorpyrifos in freshwater fish *Clarias batrachus*. *Chemosphere.* 2015; 132: 172-178.

- Padh H.** Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem Cell Biol.* 1990; 68: 1166-1173.
- Pal AK, Jadhao SB, Garg UK, Jha GJ.** Haemato-biochemical ve immuno-pathophysiological effects of chronic toxicity with synthetic pyrethroid, organophosphate and chlorinated pesticides in broiler chicks. *Int Immunopharm.* 2004; 13(4): 1709-1722.
- Pistl J, Kovalkovicova N, Holovska VV, Legath J, Mikula I.** Determination of the immunotoxic potential of pesticides on functional activity of sheep leukocytes in vitro. *Toxicology.* 2003; 188 (1):73-81.
- Rao M, Narayana K, Benjamin S, Bairy KL.** L-Ascorbic acid ameliorates postnatal endosulfan induced testicular damage in rats. *Indian J Physiol Parmacol.* 2005; 49: 331–336.
- Satoh K.** Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta.* 1978; 90: 37-43.
- Segasothy M, Pang KS.** Acute interstitial nephritis due to endosulfan. *Nephron.* 1992; 62: 118.
- Sharma S, Dewan A, Singh G.** Toxicovigilance: an inevitable prerequisite to keep a watch on toxins around you. *J Forensic Leg Med.* 2017; 45: 32–35.
- Simonich SL, Hites RA.** Global distribution of persistent organochlorine compounds. *Science.* 1995; 29:1851–1854.
- Singh PP, Kumar A, Chauhan RS, Pankaj PK.** Effect of endosulfan on immunological competence of layer birds. *Veterinary World.* 2016; 9: 777-782.
- Sohn H, Kwon C, Kwon G, Lee J, Kim E.** Induction of oxidative stress by endosulfan and protective effect of lipid-soluble antioxidants against endosulfan induced oxidative damage. *Toxicol Lett.* 2004; 151: 357–365.
- Targher G, Bertolini L, Rodella S, Lippi G, Franchini M, Zoppini G, Muggeo M, Day CP.** NASH Predicts Plasma Inflammatory Biomarkers Independently of Visceral Fat in Men. *Obesity.* 2008; 16(6):1394-1399.
- Xu D, Li S, Lin L, Qi F, Hang X, Sun Y.** Gene expression profiling to identify the toxicities and potentially relevant disease outcomes due to endosulfan exposure. *Toxicol Res.* 2016; 5: 621-632.
- Xu D, Liu T, Lin L, Li S, Hang X, Sun Y.** Exposure to endosulfan increases endothelial permeability by transcellular and paracellular pathways in relation to cardiovascular diseases. *Environ Pollut.* 2017; 223: 111–119.
- Videla LA.** Oxidative stress signaling underlying liver disease and hepatoprotective mechanisms. *World J Hepatology.* 2009; 1: 72-78.
- Zhang P, Zhu W, Wang D, Yan J, Wang Y, Zhou Z, He L.** A combined NMR- and HPLC-MS/MS-based metabolomics to evaluate the metabolic perturbations and subacute toxic effects of endosulfan on mice. *Environ Sci Pollut Res.* 2017; 24: 18870-18880.

Honamlı Keçisi ve Kıl Keçisi (Karakeçi) Kılları Üzerinde Morfolojik İncelemeler

İmdat ORHAN^{1*}, Ayhan DÜZLER¹, Aydın ALAN¹, Özkan ELMAZ², Özcan ÖZGEL³

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

²Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Zootekni Anabilim Dalı, Burdur, TÜRKİYE

³Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Burdur, TÜRKİYE

*Corresponding author e-mail: imdatorhan66@hotmail.com

ÖZ

Yapılan bu çalışma ile Kıl keçisi'nin ve Honamlı keçisi'nin kıl yapısı, ırk özellikleri, korteks, medulla, bulbus ve scopus pili'nin makro anatomik, stereo mikroskopik, ışık mikroskopik, SEM ve germe test sonuçlarının, farklı ve benzer yanlarının ortaya konulması amaçlandı. Her iki keçi ırkında gözlenen bulbus tiplerine bakıldığında ırk ayrımı bakımından önem taşıyan bir özellik saptanamadı. Honamlı keçisi kıllarının bulbus pili ve scapus pili çaplarının, kıl keçisi kıllarının bulbus pili ve scapus pili çaplarından daha büyük olduğu tespit edildi. Elde edilen rakamlar, korteks ve medulla ölçümlerinde de belirgin şekilde Honamlı keçilerinde yüksektir. Germe testi uygulamasında maksimum uzama ve maksimum kuvvete dayanma konusunda en güçlü kıllar Honamlı keçisine aittir. Ortalama esneme değerine bakılınca Kıl keçilerinin kıllarının esnekliğinin daha fazla olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Anatomi, Keçi, Kıl, Morfoloji

Morphological Investigations on The Hairs of The Honamlı Goat and The Hair Goat (Black Goat)

ABSTRACT

In this study, it was aimed that to reveal different and similar aspects of hair structures and breed characteristics with cortex, medulla, bulbus and scopus pili of these two goat breeds by macro anatomic, stereo microscopic, light microscopic, SEM and tensile test results. When we look at the types of bulbus observed in both goat breeds, a characteristic that is important in terms of breed discrimination cannot be determined. The diameters of the bulbus pili and scapus pili of Honamlı Goat were found to be greater than Hair Goat's. This difference was also found to be significantly higher of the cortex and medulla measurements in the Honamlı Goats. The strongest hairs on the maximum elongation and maximum strength on pull-test were Honamlı Goats. According to the average stretch value, Hair Goats have more flexibility

Key words: Anatomy, Hair, Goat, Morphology

To cite this article: Orhan İ. Düzler A. Alan A. Elmaz Ö. Özgel Ö. Honamlı Keçisi ve Kıl Keçisi (Karakeçi) Kılları Üzerinde Morfolojik İncelemeler. *Kocatepe Vet J.* (2018) 11(2): 173-179.

GİRİŞ

Honamlı keçisi, son yıllara kadar Kıl keçisi ırkı içinde kabul edilmekteydi. Ancak günümüzde Honamlı keçisi, Kıl keçisinden farklı morfolojik ve verim özelliklerine sahip olduğu için, ayrı bir ırk olarak kabul görmektedir. Honamlı ve Kıl keçilerinin örtü kılları, giderek azalmasına rağmen dokumacılıkta, çuval, çul, kese, çadır, ip ve halat yapımında kullanılmaktadır.

Bir kılın yapısında; medulla (core), kortex ve dıştaki cuticle (pullar) ayırt edilebilir. Bu bölümlerin oranlarından ve yapısındaki farklılıklardan kılın orijininin belirlenmesinde yararlanılmaktadır (Dyce at al. 2002, Kshirsagar ve ark. 2009, Lungu ve ark. 2007). Kıl, derinin üstünde çıkıntı yapan mil şeklinde bir gövde (scapus pili) ve deri içerisine yerleşmiş bir kök (radix pili)'den oluşur. Radix pili'nin alt ucu genişleyerek bulbus pili'yi oluşturur. Dış kısmı ölmüş, boynuzlaşmış hücrelerden oluşur. Temel bileşenleri keratin (protein), melanin (pigment) ve az miktarda metalik elementlerdir. (Dursun 2008, Deedrich ve Koch 2004b, WAVA 2012). Medulla en içte bulunan kısımdır ve bütün türlerde bulunmamakla birlikte aynı türün farklı kıllarında da bulunmayabilir. Medulla, hayvan türlerine göre farklı özellikler göstermektedir. Birçok araştırmacı medulla'yı sınıflandırmak için farklı yöntemler ve farklı isimlendirmeler kullanmışlardır. Bunların bazıları, devamlı medulla, kesikli medulla, parçalı çift medulla, devamlı çift medulla, boncuklu medulla, üçlü medulla, vakuollü medulla, cellular medulla, multicellular medulla tipleridir (Turan 2006, Deedrich ve Koch 2004b,

Lungu 2007, Marinis ve Asprea 2006, Sessions ve ark. 2009). Keçilerde ortaya çıkan tabloda ise, kompozisyonu multicellular ve düzensiz unicellular, yapısı çoklu seri ve tek seri, deseni devamlı veya parçalı, iç kenarı tarak şekilli ve düzensiz olarak nitelendirilmektedir (Marinis ve Agnelli 1993). Fusiform (iğ) şekilli hücrelerden oluşan korteks (kortex), kılın esas gövdesini oluşturur (Deedrich ve Koch 2004a-2004b). Boya kabul eden ve yumuşak yapılı ortokorteks hücreleri ile boya kabul etmeyen ve sert yapıda porokorteks hücreleri, korteksi oluşturur. Kıla rengini veren pigment maddeleri de kortekste bulunur (Turan 2006). Korteksin genişliği hayvan türlerine göre farklılık göstermektedir. Tipine göre medulla'nın da genişliğinin değiştiğini söyleyen çalışmalar mevcuttur (Marinis ve Asprea 2006, Marinis ve Agnelli 1993). Kılın en dış katmanını oluşturan kütikül tabakası kiremit dizisi şeklinde sıralanmış cornifiye hücre plaklarından ibarettir (Turan 2006). Kütikülün dış görünüşü üç farklı tipte olmaktadır. Araştırmacılar bu tiplere taç kütikül (coronal), dikensi kütikül (spinous) ve katlı-kiremit kütikül (imbricate-flattened) gibi farklı isimlendirmeler yapmışlardır (Turan 2006, Marinis ve Asprea 2006). Evcil keçilerde (Capra Hircus) kılların kütikül tabakaları kiremit tarzında enine, düzensiz dalgalı, mozaik şeklinde görünmektedir ve erkek ile dişi arasında farklılık bulunmamaktadır. Kütikül tabakaları farklı keçi ırklarında farklılıklar göstermektedir. Medulla'da ise düz kenar boşlukları ile geniş, basit ve sürekli bir yapı gözlenmektedir (Gharu ve Trivedi 2015).

Tablo 1. İstatistik Tablosu

Table 1. Statistical Table

	Honamlı Keçisi				Kıl Keçisi			P değeri
	N	Min	Max	Ortalama ± Std. sapma	Min	Max	Ortalama ± Std. sapma	
Kuvvet	30	0,557	2,947	1,369 ± 0,700	0,440	1,889	1,047 ± 0,317	0,026*
Kalınlık	30	0,060	0,230	0,126 ± 0,039	0,070	0,110	0,089 ± 0,012	<0,001***
Bulbus Pili	10	0,090	0,220	0,180 ± 0,043	0,080	0,200	0,150 ± 0,043	0,138
Kütikül	10	0,410	0,490	0,450 ± 0,029	0,250	0,310	0,280 ± 0,018	<0,001***
Scapus Pili	10	0,060	0,110	0,090 ± 0,016	0,050	0,090	0,080 ± 0,014	0,151
Medulla	10	0,020	0,026	0,023 ± 0,002	0,017	0,020	0,018 ± 0,001	<0,001***
Cortex	10	0,016	0,021	0,019 ± 0,002	0,015	0,019	0,017 ± 0,001	0,012*

Honamlı keçisi, son birkaç yıla kadar Kıl keçisi ırkı içerisinde kabul edilmiştir (Alizdehasl ve Ünal 2011, Tagem 2009, Elmaz ve ark. 2012a-b). Ancak Kıl keçisinden farklı morfolojik ve verim özelliklerine sahip olduğu için, 17 Kasım 2015 tarihinde ayrı bir ırk olarak tescil edilmiştir (Resmi gazete 2015).

Kıl keçisi ve Honamlı keçisi'nin kıl morfolojisi üzerinde çalışma yapılması ile bu iki keçi ırkının kıl yapısı, ırk özellikleri, korteks, medulla, bulbus ve scapus pili'nin makro anatomik, stereo

mikroskopik, ışık mikroskopik, SEM ve germe testi sonuçlarının, farklı ve benzer yanlarının ortaya konulması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada, Türkiye'nin Akdeniz bölgesinde yer alan Burdur ili Mehmet Akif Ersoy Üniversitesindeki keçilerden aynı üniversitenin yerel etik kurulunun 12.03.2014 tarih ve 74 karar sayılı izni ile alınan kıllar kullanıldı. Kıl incelemeleri için 10 adet yetişkin erkek kıl keçisi ve 10 yetişkin erkek

Honamlı keçisinden yararlanıldı. Çalışmada "extraction force" yöntemi kullanılarak kökleri ile birlikte alınan kalın, uzun ve sert yapılı üst kıl örnekleri kullanıldı.

Işık mikroskopik inceleme için kıllar, üzerindeki toz ve kirin arındırılması için distile su ile hazırlanan sabunlu solüsyon ile 1-2 dakika yıkandı. Daha sonra distile su ile 3 kez (3 ayrı kaptan) durulandı. Kılların maksimum çapı, medullanın maksimum çapı ve medulla index (medulla'nın maksimum çapı / kılın maksimum çapı) değerleri belirlendi.

Koyu renkli ve yoğun pigmentli kıllarda, korteksin opak olmasından dolayı medulla görülemedi. Kılın mikroskopik incelemesi için gerekli olan şeffaflaştırma ve renksizleştirme işlemi kıllar eterde yıkandıktan sonra hidrojen peroksit ve amonyak karışımına daldırıldı. Kıl istenilen şeffaflığa ulaşana kadar içerisinde bekletildi. Medulla'nın içerisinde bulunan havanın uzaklaştırılarak medulla'nın görünür hale gelmesi için ksilene konuldu (Kshirsagar ve ark. 2009, Linacre 2009, Marinis ve Agnelli 1993, Gharu ve Trivedi 2015). Kıl üzerinde görülebilir hale getirilen tüm anatomik yapılar mevcut ışık mikroskobu (Zeiss primo star) ve stereo mikroskop ile incelendi. Mikroskoba monte edilen dijital kamera (ToupCam usb-2.0 10MP) yardımıyla görüntüler bilgisayara aktarıldı. Kamera ile birlikte temin edilmiş olan bilgisayar programı (ToupView ver.3,5) sayesinde ölçümler yapılarak kayıt altına alındı ve değerlendirildi.

Diseksiyon mikroskobu altında el becerisi ile kesitler yapıldı. Mikro pens ile tutulan kıllar tek tek mikro bisturi yardımıyla uzunlamasına ya da enine kesilerek hazırlandı. Elektron mikroskopik inceleme için, kıllar ve hazırlanan kesitleri özel bant ile metal plaka üzerine yerleştirildi. POLARON SC7620 Sputter Coater ile altın-palladium (AU/PD) ile kaplandı. LEİCA LEO 440 marka ve model elektron mikroskop altında çeşitli büyütme ile görüntülendi.

Germe testleri için hassas uç takılmış Shimadzu AG-X autograph cihazı kullanıldı. 10 adet Honamlı ve 10 adet Kıl keçisinin regio interscapularis'inden alınan 3 farklı kalınlıkta kıl, toplam 60 adet test sonucu raporlandı. Germe testleri 2 mm/dk, 5mm/dk ve 10 mm/dk olarak üç farklı hızda denendi.

Honamlı ve Kıl keçilerinde kuvvet ve kalınlık ölçümleri arasındaki farkların istatistiksel kontrolünde Student T- testi kullanılmıştır. Kalınlık ve kuvvet arasındaki ilişkinin belirlenmesi Pierson Corelation katsayısı ile yapılmıştır. Kuvvet ve kalınlık arasındaki matematiksel model basit regresyon

analizi ile yapılmıştır. İstatistik analizlerinde NCSS 9.0 paket programı kullanılmıştır.

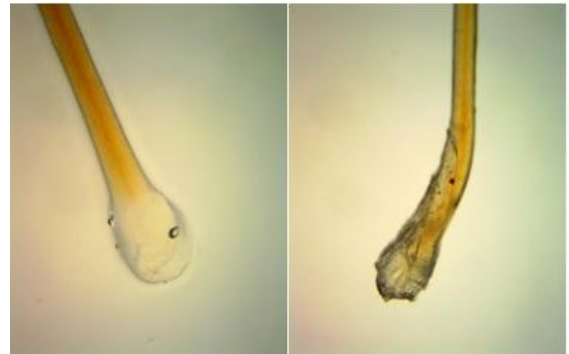
BULGULAR

Aynı hayvana ait kıl numunelerinde bile kıl kalınlıkları ve uzunluklarının birbirinden farklı olduğu görülmüştür. Fakat ortalama değerleri göz önüne alındığında kıl keçisinin kıllarının Honamlı keçilerininkinden daha ince olduğu belirlendi ($p < 0,001$).

Kılların deri içerisinde farklı şekillere sahip genişlemeler gösterdiği tespit edildi. Bulbus pili'lerin genişlemesinin yanında yassılaştırma da gösterdiği saptandı. Genellikle bulbus'un oval ve yassı oval karakterde olduğu görüldü.

Her iki keçi ırkından alınan tüm örneklerde, aynı kıl örneğinin bulbus pili çapının kılın gövde çapından 0.05 mm den 0.1 mm'ye kadar fazla olduğu belirlendi. Bulbus pili'lerin düz kalınlaşma, kabartı, boğumlu kabartı, kıvrılmış, kanca, sivri kenarlı kabartı gibi çok çeşitli görünümlere sahip olduğu gözlemlendi. Kıl keçilerinde alınan örneklerde yapılan ölçümlerde bulbus'un ortalama 0,15 mm (0.08-0.20) çapa sahip olduğu belirlendi. Aynı bölüm için Honamlı keçisinde çap ortalaması 0.18 mm (0.09-0.22) olduğu saptandı. İki ırk arasında bulbus değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Şekil yönünden, her iki keçi ırkının da sınıflandırdığımız bütün bulbus tiplerine sahip olduğu gözlemlendi. Fakat kanca tipi ve kıvrılmış bulbus pili yapısına kıl keçilerinde daha sık rastlandı. Kılların dekolizasyonunda kullandığımız yöntemler sonrasında, kılların bulbus'una ait farklı şekillerin yerini düz bir kalınlaşmaya bıraktığı görüldü. Bir başka değişle kılların farklı bulbus yapılarının ortadan kalktığı ve şekil 1'deki gibi görüldüğü belirlendi. Bu durumun her iki ırkta da aynı olduğu tespit edildi.



Şekil 1. Honamlı keçisinde bulbus pili (şeffaflaştırılmış-20X).

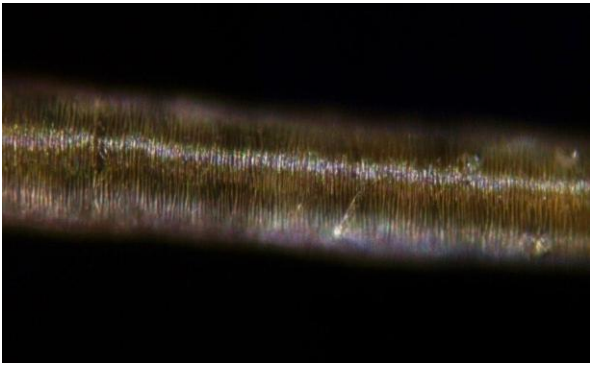
Figure 1. Bulbus pili of Honamlı Goat (transparented-20X).

Bulbus pili'nin SEM görüntülerinde (Şekil 2) scapus pili'den belirgin bir kalınlaşma ile ayrıldığı, kalınlaşmanın kıl kökünün ucuna doğru azalarak yani sivrilerek sonlandığı gözlemlendi. Honamlı keçilerinin kıllarında bulbus pili çapının en çok 0.22 mm, kıl keçilerinde ise en çok 0.20 mm olduğu tespit edildi.

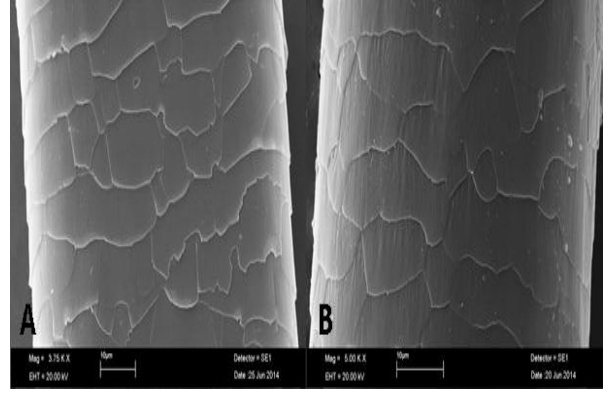


Şekil 2. Kıl keçisinde bulbus pili (SEM-425X).
Figure 2. Bulbus pili of Hair Goat (SEM-425X).

Kıl gövdesinde (scapus pili'de), medulla ve cortex bölümleri ayrıtıldı. Scapus pili'nin dış yüzünde, hem Kıl keçisi hem de Honamlı keçisi kıl örneklerinde katlı-kremite kutikül (imbricate-flattened) dizilişi görümlü kutikül yapısı gözlemlendi (Şekil 3, 4 ve 5). İki keçi ırkının kıllarındaki kutikül kalınlıkları karşılaştırıldığında Honamlı keçisinin kutikül kalınlığının (ortalama: 0.45 μ) Kıl keçisinininkinden (ortalama: 0.28 μ) yaklaşık iki kat daha fazla olduğu belirlendi ($p < 0,05$) (Şekil 4,5).

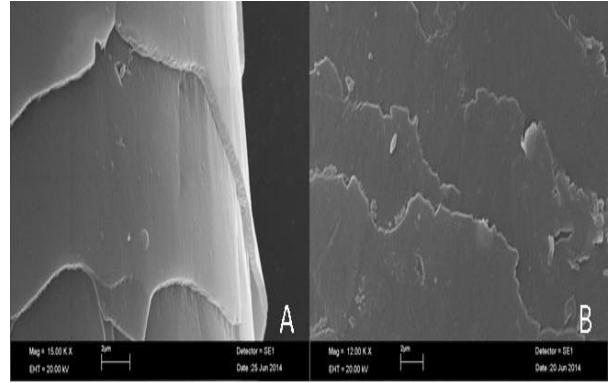


Şekil 3. Kıl keçisinde scapus pili'nin dış görünüşü, kutikül yapısı (Zeiss-40X).
Figure 3. The external appearance and cuticle structure of scapus pili in Hair Goat (Zeiss-40X)



Şekil 4. Honamlı keçisinde (A) ve Kıl keçisinde (B) scapus pili'nin dış görünüşü, kutikül yapısı.

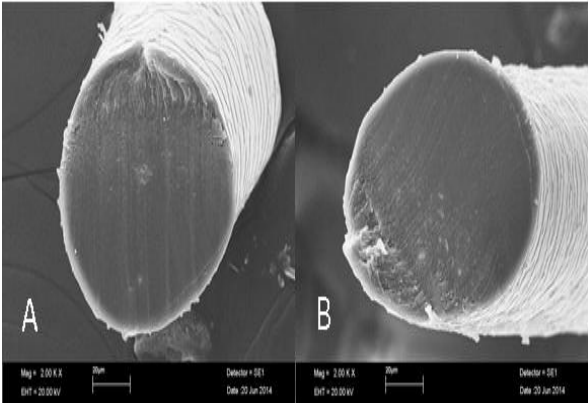
Figure 4. The external appearances and cuticle structures of scapus pili in Honamed Goat (A) and Hair Goat (B).



Şekil 5. Honamlı keçisinde (A) ve Kıl keçisinde (B) scapus pili'nin dış görünüşü, kutikül yapısı.

Figure 5. The external appearances and cuticle structures of scapus pili in Honamed Goat (A) and Hair Goat (B).

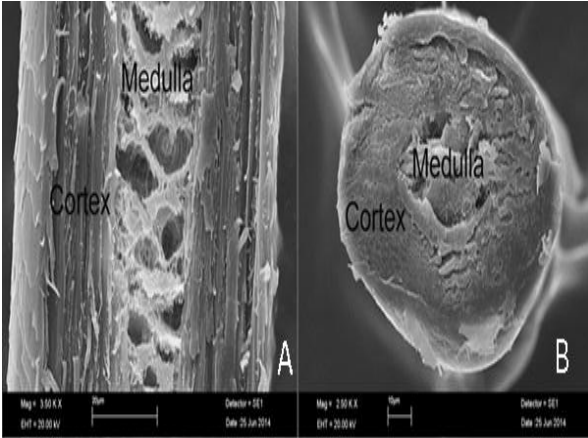
Scapus pili'nin kesit çapları (Şekil 6) SEM, ışık ve diseksiyon mikroskobu yardımıyla farklı yöntemlerle ölçüldü. Yapılan ölçümlerde kıl çapları Honamlı keçilerinde ortalama 0.09 mm (0.06-0.11) iken, Kıl keçilerinde ortalama 0.08 mm (0.05-0.09) olarak ölçüldü. İki keçi ırkı arasında scapus pili değerleri arasında istatistik olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p < 0,05$).



Şekil 6. (A) Kıl keçisinde ve (B) Honamlı keçisinde scapus pili'nin kesit yüzü (SEM-2000X).

Figure 6. The cross-section of scapus pili in Honamlı Goat (A) and Hair Goat (B) (SEM-2000X).

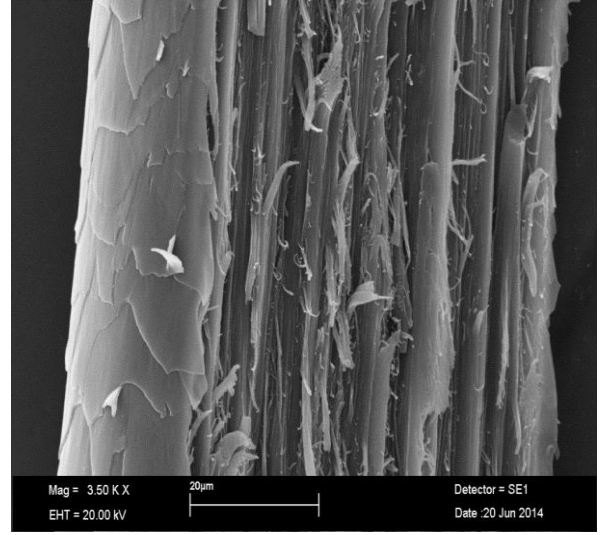
Kıl kesitlerinin görüntülerinde scapus pili'nin iç kısmında boşluklar ve odacıklar şeklinde bir medulla bulunmaktaydı (Şekil 7). Gözlenen boşlukların süngerimsi delikli septal plakalarla birbirinden ayrıldığı, bir kılın uzunluğunun tamamında homojen bir medulla olmadığı tespit edildi. Yer yer medullanın boşluklu yapısının kaybolduğu ve yerini spongiöz septal bir görünüme bıraktığı belirlendi.



Şekil 7. Honamlı keçisinde scapus pili'nin longitudinal (A) ve transversal (B) kesiti.

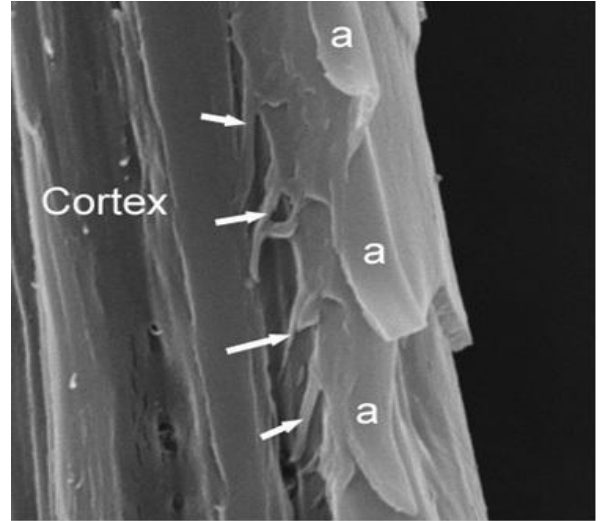
Figure 7. The longitudinal section (A) and cross-section (B) of scapus pili in Honamlı Goat.

Kortex'te ise lamellar lifli bir yapının mevcut olduğu belirlendi (Şekil 7, 8). Kortex'in medulla'ya nazaran daha kompakt bir yapıda olduğu görüldü. Kortex'ten medulla'ya yaklaştıkça lameller arasındaki sıkı bağlantının gevşediği, iç kesimlerde lamellerin daha gevşek bağlandıkları gözlemlendi. Kütikül plakaların kortex pili'nin dış yüzüne sıkıca tutunmuş ve birbiri üzerine gelecek şekilde düzenli dizilmiş oldukları görüldü (Şekil 8). Kütikül plakaların kortex pili'ne vertical şeritler aracılığıyla tutunduğu tespit edildi (Şekil 9).



Şekil 8. Kıl keçisinde kortex pili'nin lamelli lifli yapısı (SEM-3500X).

Figure 8. Lamellar fibrous structure of kortex pili in Hair Goat (SEM 3500X).



Şekil 9. Kıl keçisinde kütüküllerin kortex pili'ne tutunması (SEM-10000X).

Figure 9. Attachment of cuticles to kortex pili in Hair Goat (SEM-10000X).

Kılın farklı bölümlerinde kalınlıkları ve birbirine oranları değişmekle birlikte Honamlı keçilerinde medulla'nın ortalama 0.023 mm çapında olduğu ve ortalama 0.019 mm kalınlığındaki kortex ile çevrelediği belirlendi. Kıl keçilerinden alınan kıl numunelerinde ise medulla'nın ortalama çapının 0.018 mm, kortex'in ortalama kalınlığının 0.017 mm olduğu saptandı. Bu sonuçlara göre Honamlı Keçinin Kıl keçisine göre daha kalın bir medulla ve kortex'e sahip olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$).

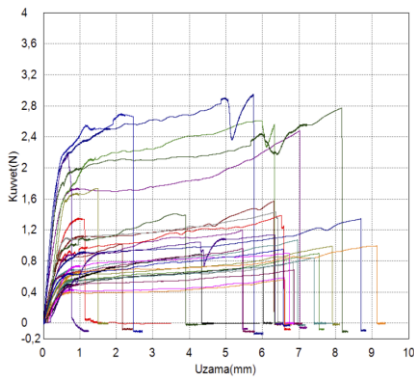
TARTIŞMA ve SONUÇ

Kıl kalınlığı ile kuvvet arasındaki korelasyon katsayısı Honamlı Keçisinde 0,78 olarak hesaplanmış, Kıl keçisinde ise 0,48 bulunmuştur ($p<0,01$). Bu ilişki matematiksel olarak modellendiğinde oluşturulan regresyon denklemleri:

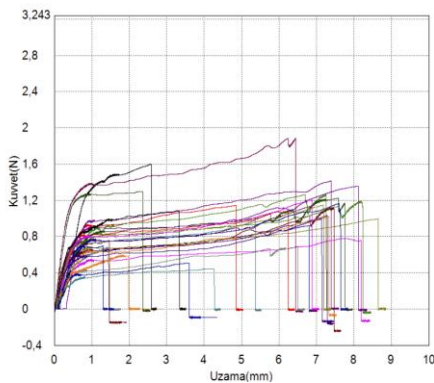
Honamlı keçisi için $Kuvvet = -0,375 + 13,87 \times$
kalınlık ($R^2 = 0,605$)

Kıl Keçisi için $Kuvvet = -0,059 + 12,43 \times$
kalınlık ($R^2 = 0,227$)

İki ırktan 10'ar keçinin regio interscapularis'inden alınan örneklerde kaydedilen germe testi değerleri grafiklerde verilmiştir. Honamlı ve Kıl keçileri arasında çekme kuvveti değerleri arasındaki fark istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Honamlı keçinin kuvvet ortalaması ($1,369 \pm 0,70$), Kıl keçisinden ($1,047 \pm 0,317$) daha fazladır. Bu değerlerden anlaşılmaktadır ki Honamlı keçilerinin kılları Kıl keçilerinin kıllarına kıyasla gerilmeye daha dayanıklıdır. Maksimum uzama ve maksimum kuvvete dayanma konusunda en güçlü kıllar Honamlı keçisine ait iken ortalama esnekliğe yani uzama ortalama değerine bakılınca Kıl keçilerinin kıllarının esnekliğinin ya da uzamasının daha fazla olduğu görülmüştür (Grafik 1 ve 2).



Grafik 1. Honamlı Keçisi Germe testi grafiği
Graphic 1. Graphic of tensile test of Honamlı Goat



Grafik 2. Kıl Keçisinde Germe testi grafiği
Graphic 2. Graphic of tensile test of Hair Goat

Gözlenen bulbus tiplerine bakıldığında ırk ayrımı bakımından önem taşıyan bir özellik saptanamamıştır. Ancak farklı tipte bulbus pili yapılarının gözlenmesi kılın deri içerisindeki duruşu ya da örnek alınması sırasında kuvvet uygulanmasından da kaynaklanmakta olabileceği ihtimali akla gelmektedir. Çünkü beyazlatma işlemleri sırasında kimyasallarla muamele edildikten sonra tek tip bulbus pili görülmesi dikkat çekmiştir. Bu durum bulbus pili'lerin benzer ve tek tip olduğu ancak deriden kopartılması sırasında kıvrıldığı ya da uzadığını düşündürmektedir.

Çalışmamızda scapus pili'nin dış yüzünde, hem Kıl keçisi hem de Honamlı keçisi kıl örneklerinde gözlenen katlı-kremet kütikül (imbricate-flattened) dizilişi Gharu ve Trivedi 2015 tarafından belirtilen tipler arasında bulunmaktadır. Honamlı ve Kıl keçilerinde kütikül tabakalarının farklılığı literatürde belirtildiği gibi keçi ırkları arasındaki kütikül tabakalarının birbirinden farklı olması ile örtüşmektedir.

Kıl keçilerinde Şengonca (1974) tarafından, omuz bölgesinden alınan kaba üst kılların kalınlığının ortalama 0,044-0,126 mm olduğunu bildirilmiştir. Yaptığımız çalışmada regio interscapularis'ten alınan kıllarda kalınlık ortalaması, Honamlı keçilerinde 0,09 mm iken, kıl keçilerinde 0,08 mm olarak belirlendi. Kıl keçileri kıl kalınlığı ortalaması literatürle uyumludur. Honamlı keçilerinin kıl kalınlığı ise hem literatürde verilen hem de çalışmamızda belirlenen kıl keçisi kıllarının kalınlıklarından daha fazladır (Dellal 2001a-b, Ksihirgar 2009, Yıldız 2004).

Hem kıl keçilerinde hem de Honamlı keçilerinde kütiküllerin kortex pili'ye küçük köprülerle tutunduğu gözlenmiştir (şekil 9). Bu bulgu, kılların SEM incelemesinde, el becerisi ile yapılmış longitudinal kesitlerinden tespit edilmiştir. Uygulanan bu kesit metodunun daha önceki çalışmalarda kullanılmaması sebebiyle daha önceki çalışmalarda böyle bir bulguya rastlanmamıştır.

Germe testinde kullanılan kuvvet, farklı hız (2mm/dk, 5mm/dk ve 10mm/dk) uygulamalarında farklı sonuçlar doğurmuştur. Bunlardan 2 mm/dk'lık hız aşırı uzamaya neden olurken, 10 mm/dk'lık hız da ani kopmalara yol açmaktadır. Uygulanan hızlardan 5mm/dk olanı daha sağlıklı sonuçlar vermiştir.

Keçilerde vücudun farklı bölgelerinden alınan kıl örneklerinde kalınlıkların farklı olduğu belirlenmiştir. Uygulanan germe testlerinde kılların çapları dikkate alındığında birim dayanıklılığında farklılık olmadığı görülmüştür.

Regio interscapularis'den alınan örneklerde kaydedilen değerlere göre Honamlı keçilerinin kılları Kıl keçilerinin kıllarına kıyasla germe testinde daha büyük direnç göstermiştir. Maksimum uzama ve maksimum kuvvete dayanma konusunda en güçlü kıllar Honamlı keçilerine aittir. Ortalama esneme değerine bakılınca Kıl keçilerinin kıllarının esnekliğinin daha fazla olduğu görülmüştür. Bu durum bölgeler arasındaki kıl dayanıklılığı ile de uyumludur.

KAYNAKLAR

- Alizadehasl M, Ünal N.** Some morphological traits of Kilis, Norduz and Honamlı indigenous goats breeds. *Lalahan Hay Araştır Derg.* 2011; 51(2):81-92.
- Deedrick DW, Koch SL (a).** Microscopy of hair part II: A practical guide and manual for animal hairs. *Forensic Sci Com.* 2004; 6(3).
- Deedrick DW, Koch SL (b).** Microscopy of hair part II: A practical guide and manual for animal hairs. *Forensic Sci Com.* 2004; 6(3).
- Dellal G, Eliçin A, Söylemezoğlu F, Erdoğan Z, Arık İ.Z (a).** Some physical characteristics and utilization of down fiber obtained from hair goats. *Turk J Vet Anim Sci.* 2001; 25:581-587.
- Dellal G, Eliçin A., Erdoğan Z, Söylemezoğlu F., Arık İ.Z (b).** Some physical characteristics and utilization of down fiber obtained from hair goats. *Turk J Vet Anim Sci.* 2001; 25:589-596.
- Dursun N.** Veteriner Anatomi III, 7. Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara, TÜRKİYE. 2008; pp. 189-192.
- Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG.** Textbook of Veterinary Anatomy, 4th Ed., Saunders, Missouri, USA. 2002; pp. 357-361.
- Elmaz O, Saatci M, Dag B, Aktas AH, Ata A, Gulay MS, Mamak N, Gok B (a):** Some descriptive characteristics of a new goat breed called Honamlı in Turkey. *Trop Anim Health Prod.* 2012; 44:1913-1920.
- Elmaz O, Saatci M, Mamak N, Dag B, Aktas AH, Gok B (b).** The determination of some morphological characteristics of Honamlı goat and kids, defined as a new indigenous goat breed of Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2012; 18(3):481-485.
- Gharu J, Trivedi S.** Comparison of cuticle scale patterns, medulla and pigment in hairs of domestic goat, sheep, cow and buffalo from

Rajasthan (India). *J Chem Bio Phy Sci B.* 2015; 5(1): 570-7.

- Kshirsagar SV, Singh B, Fulari SP.** Comparative study of human and animal hair in relation with diameter and medullary index. *Indian J Forensic Med Path.* 2009; 2(3):105-108.
- Lungu A, Recordati C, Ferrazzi V, Gallazzi D.** Image analysis of animal hair: morphological features useful in forensic veterinary medicine. *Lucrari Stiintifice Medicina Veterinara.* 2007; 40:439-46.
- Linacre A.** Forensic Science in Wildlife Investigations, International Forensic Science and Investigation Series, CRC Press, Florida, A.B.D. 2009; pp. 637-41.
- Marinis AM, Agnelli P.** Guide to the microscope analysis of Italian mammals hairs: Insectivora, Rodentia and Lagomorpha. *Bolletino di zoologia.* 1993; 60(2):225-32.
- Marinis AM, Asprea A.** Hair identification key of wild and domestic ungulates from southern Europe. *Wildlife Biology.* 2006; 12(3):305-20.
- Resmi gazete.** Yerli hayvan ırk ve hatlarının tescili hakkında tebliğ. 2015; Madde 1. Ek-59.
- Sessions BD, Hess WM, Skidmore WS.** Can hair width and scale pattern and direction of dorsal scapular mammalian hair be a relatively simple means to identify species?. *Journal of Natural History.* 2009; 43: 489-507.
- Şengonca M.** Keçi Yetiştirme, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları Serisi No. 222, Bornova, İzmir. 1974; pp. 136.
- TAGEM** Türkiye Evcil Hayvan Genetik Kaynakları Tanıtım Kataloğu. 2009; pp. 76-83.
- Turan SF.** Karkas yapısı, kıl morfolojik özellikleri ve yağ asitleri kompozisyonlarına göre et hayvan türlerinin tanınması üzerine bir araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2006.
- WAVA, ICVGAN.** Nomina Anatomica Veterinaria, 5th Ed., Knoxville, USA. 2012; pp. 155-8.
- Yıldız D, Gültiken ME, Bolat D.** A Scanning elektron microscopic investigation of the mohair in Turkish Angora goats. *Ankara Univ Vet Fak Derg.* 2004; 51: 225-7.

Afyonkarahisar'dan Toplanan Çiğ Manda Sütlerinde *Salmonella* spp. Varlığının Araştırılması[#]

Ulaş ACARÖZ^{1*}, Recep KARA¹, Zeki GÜRLER¹, Damla ARSLAN-ACARÖZ², Fahriye ZEMHERİ³

¹Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, Türkiye

²Afyon Kocatepe Üniversitesi, Bayat Meslek Yüksek Okulu, Laborant ve Veteriner Sağlık Bölümü, Afyonkarahisar, Türkiye

³Bartın Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Bartın Türkiye

[#] Bu çalışmanın bir kısmı 4th International VET-Istanbul Group Congress, Almati, KAZAKISTAN'da (2017) özet bildiri olarak sunulmuştur.

*Corresponding author e-mail: ulasacaroz@hotmail.com

ÖZ

Gıda kaynaklı önemli bir patojen ve zoonoz olan *Salmonella* spp. et, yumurta, peynir ve çiğ süt gibi hayvansal gıdaları kontamine ederek gıda kaynaklı salgınlara neden olabilmektedir. Yapılan bu çalışmada Afyonkarahisar'da çiğ manda sütlerinde *Salmonella* spp. varlığının ve kontaminasyon düzeyinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, manda sütü üreticilerinden temin edilen 100 adet çiğ manda sütü örneği steril kaplara alınarak soğuk zincir altında laboratuvara ulaştırıldı ve ISO 6579 metoduna göre *Salmonella* spp. varlığı bakımından analize alındı. Analize alınan çiğ manda sütü örneklerinin 2 tanesinde (%2) *Salmonella* spp. izole edildi ve PCR tekniği kullanılarak onaylandı. Sonuç olarak, Afyonkarahisar'dan toplanan çiğ manda sütlerinde *Salmonella* spp.'nin yaygın olarak bulunmadığı tespit edilmiştir. Ancak, *Salmonella* enfeksiyonlarının hafif seyirli gastroenteritlerden, ciddi sepsisemilere kadar sağlık problemlerine neden olabileceği göz önünde bulundurulduğundan, *Salmonella* spp.'nin sütlerden eliminasyonunda pastörizasyon işleminin önemli rol oynadığının göz ardı edilmemesi, süt işletmelerinde çalışan personelin bu konuda bilgilendirilmesi ve işletmelerde hijyen ve sanitasyon kurallarına uyulması önerilmektedir.

Anahtar kelimeler: *Salmonella* spp., Manda Sütü, Hijyen, PCR

An Investigation on the Presence of *Salmonella* spp. in Raw Water Buffalo Milks Collected from Afyonkarahisar Province

Abstract

Salmonella spp., important foodborne pathogens and zoonoses, can cause food-borne outbreaks by contaminating food of animal origin such as meat, eggs, cheese, and raw milk. This study aimed to determine the presence and the contamination level of *Salmonella* spp. in raw buffalo milk samples collected from Afyonkarahisar. For this purpose, 100 milk samples collected from buffalo milk producers were taken aseptically and transferred to the laboratory under cold chain conditions, followingly samples were analyzed according to the method of ISO 6579. Two *Salmonella* spp. were isolated from the collected buffalo milk samples and they were confirmed by means of the PCR technique. Consequently, it was determined that *Salmonella* spp. was not widely found in raw buffalo milk collected from Afyonkarahisar. However, considering that *Salmonella* infections may cause health problems from mild gastroenteritis to severe septicemia, it is recommended that the staff working in dairy companies should be informed about to obey hygiene and sanitation rules and the importance of pasteurization process in elimination of this food pathogens.

Keywords: *Salmonella* spp., Buffalo Milk, Hygiene, PCR

To cite this article: Acaröz U. Kara R. Gürler Z. Damla Arslan-Acaröz, Fahriye Zemheri. Afyonkarahisar'dan Toplanan Çiğ Manda Sütlerinde *Salmonella* spp. Varlığının Araştırılması. Kocatepe Vet J. (2018) 11(2): 180-185.

GİRİŞ

Süt, büyüme ve gelişme için gerekli olan lipid, protein, aminoasit, vitamin ve mineral gibi birçok besin ögesi açısından zengin bir besin kaynağıdır. Ayrıca, bileşiminde immünglobulinler, hormonlar, büyüme faktörleri, sitokinler, enzimler bulunmaktadır. (Tekinşen 2000, Haug ve ark. 2007). Değerli bir süt olan manda sütü peynir, tereyağı, yoğurt gibi birçok süt ürününün üretimi için gerekli olan zengin bir besin içeriğine de sahiptir. İnek sütü ile karşılaştırıldığında daha yüksek oranda yağ, protein, laktoz içermektedir. Birçok ülkede özellikle zengin besin içeriğinden dolayı araştırmacıların ve yatırımcıların ilgisini çekmektedir (Amarjit ve Toshihiko 2003, Han ve ark. 2007). TÜİK verilerine göre Ülkemizdeki toplam manda sayısının yaklaşık %4'ü Afyonkarahisar'da olup, manda sütü üretimi bakımından ise 7. sırada yer almaktadır (Anonim 2018). Yüksek besin içeriğine sahip olan manda sütü uygun olmayan koşullarda sağımı taşınması, işlenmesi ve muhafazası gibi nedenlerden dolayı patojen mikroorganizmalar ile kontamine olabilmekte ve halk sağlığı açısından büyük bir tehdit oluşturabilmektedir (Han ve ark. 2007, Lejeule ve Rajala-Schultz 2009, Beale ve ark. 2014). *Salmonella* spp yüksek düzeyde morbidite ve mortaliteye sebep olabilmekte birlikte kontamine ettikleri gıdaların tüketimiyle hafif ya da şiddetli gıda zehirlenmelerine neden olabilirler. Bu bakteriler bulantı, kusma, baş ağrısı, sepsisemi, ishal, ateş gibi klinik semptomlara neden olurlar (Kahraman ve ark. 2010, Scallan ve ark. 2011, Yıldırım ve ark. 2016). *Salmonella* spp. gıdaları çeşitli yollar ile bulaşabilmekte ve özellikle *Salmonella* taşıyıcısı olan çiftlik hayvanlarının gıda üretiminde kullanılmasıyla, bu hayvanlardan elde edilen süt, et, yumurta gibi ürünler kontamine olabilmektedir. (Finstad ve ark. 2012, Sağlam ve Şeker 2016). Bu nedenle hayvansal kaynaklı gıdalar, *Salmonella* türlerinin en yaygın olarak bulunduğu gıdaların başında gelmektedir (Kaynar 2011). Ülkemizde (Soyutemiz ve ark. 2000, Ekici ve ark. 2004, Issa ve ark. 2010) ve diğer ülkelerde (D'amico ve ark. 2008, Karshima ve ark. 2013, Gwida ve Al-Ashmawy 2014, İbrahim ve ark. 2015, El-Baz ve ark. 2017) özellikle inek sütlerinde yapılan çalışmalarda çiğ sütlerin *Salmonella* spp için önemli bir kontaminasyon kaynağı olduğu görülmektedir. Bu çalışmada Afyonkarahisar ilinden toplanan çiğ manda sütlerinde gıda kaynaklı bir zoonoz olan ve halk sağlığı açısından önem arz eden *Salmonella* spp. varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Bu çalışmada Afyonkarahisar ilinden Mart-Haziran 2016 tarihleri arasında manda sütü üreticilerinden

100 çiğ manda sütü örneği toplandı. Steril kaplara alınan süt örnekleri soğuk zincir altında laboratuvara getirilerek aynı gün analize alındı.

Salmonella spp izolasyon ve İdentifikasyonu

Toplanan süt örneğinde *Salmonella* spp. varlığı ISO 6579 (Anonim 2002) metoduna göre yapıldı. Her bir örnekten 25 ml alınarak, üzerine 225 ml tamponlanmış peptonlu su (Oxoid, CM0509) ilave edilerek 37±1°C'de 18±2 saat inkübe edildi. Bu işlemi takiben, Homojenattan 1 ml Rapoport Vasilliadis Broth'a (Oxoid, CM0669) aktarıldı ve 41,5±1°C'de 24±3 saat inkübe edildi. Selektif zenginleştirme işleminden sonra Xylose-Lizin-Desoksikolat Agar (Oxoid, CM0469) ve Modified Brilliant Green Agar'a (Oxoid CM0329) ekim yapıldı ve 37±1°C'de 24±3 saat inkübe edildi. Şüpheli kolonilere Biyokimyasal ve serolojik testler uygulandı.

PCR ile izolatların doğrulanması:

İdentifiye edilen *Salmonella* spp. suşlarının PCR ile onaylanması amacıyla DNA ekstraksiyonu, DNA izolasyon kiti (Qiagen DNeasy® DNA İzolasyon Kiti, Almanya) ile üretici firma tarafından belirtilen protokole göre yapıldı. İzole edilen DNA'lar kalite kontrolü amacıyla %1'lik agaroz jelde görüntülendi ve DNA absorbansları 260, 280 ve 230 nm' de µDrop spektrofotometride Multiskan™ FC Mikroplate Fotometre (Thermo, ABD) cihazında ölçüldü. Primer tasarımında NCBI web sitesinden *Salmonella* spp.'e özgü *invA* genine ait DNA dizisine göre (Tablo 1) Yuan ve ark. (2009) tarafından tasarlanan primerler FastPCR 6.0 (Kalendar ve ark. 2009) bilgisayar paket programından faydalanılarak kontrol edildi. Sipariş edilen primerler liyofilize olarak temin edildi. Daha sonra üretici firmanın önerdiği miktarlarda steril bidistile su ile 100 µmol konsantrasyonda olacak şekilde sulandırıldı. PZR karışımı Taq DNA Polimeraz (AmpliQon, Danimarka) kullanılarak her bir örnek için 25 µl'lik final hacimde olacak şekilde 2 µl DNA, her bir primerden 0,2 µM, 1,5 mM MgCl₂, 10x buffer solüsyonu, her bir dNTP'den 0,2 mM ve 3U Platinum Taq DNA Polimeraz olacak şekilde hazırlandı. PCR ön denatürasyon basamağı (95°C, 3 dk), takiben denatürasyon (95°C, 30 sn), primer yapışması (60°C, 30 sn) ve uzatma (72°C, 30 sn) 40 döngü, son uzatma basamağı (72°C, 5 dk) olacak şekilde programlandı. (T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad, ABD). PCR ürünleri ve marker (Thermo Scientific, ABD) 1x TAE (Tris-Asetat-EDTA) solüsyonunda %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra Safe DNA jel boyası (İnvitrogen, ABD) ile boyanarak, UV altında jel görüntüleme ve analiz sistemi (Vilber Lourmat, Marine la Valeé, France) ile görüntülendi.

Tablo 1. Çalışılan *invA* genine ait primer dizilimi
Table 1. Primer Sequencing of the *invA* Gene

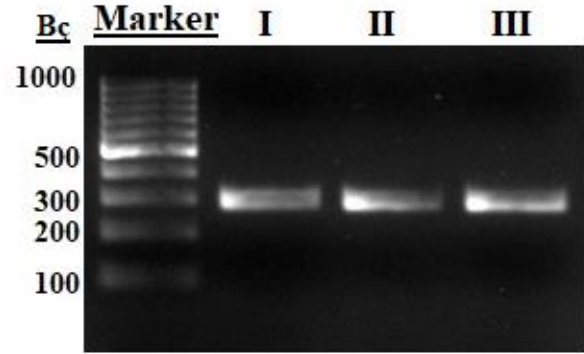
Gen	Oligonükleotid dizisi (5'-3')	Ürün boyutu (bp)	Gen Bankası No
<i>invA</i>	F GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA	285	M90846.1
	R TCATCGCACCGTCAAAGGAACC		

BULGULAR

Analiz edilen 100 manda süt örneğinden 2'sinin (%2) *Salmonella* spp. ile kontamine olduğu klasik kültür metodu ile belirlendi ve ayrıca bu izolatların genotipik olarak *Salmonella* spp. olduğu PCR metodu ile onaylandı (Şekil 1).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Salmonella enfeksiyonları, insanlarda ve hayvanlarda ekonomik kayıplara neden olmakla birlikte, dünyada en sık görülen ikinci zoonotik hastalık olarak bildirilmektedir (Anonim 2011, Şahan et al. 2016). Çiftlikte uygun olmayan hijyen koşulları, gıda üretimindeki çalışanlardan kaynaklanan kontaminasyon riskleri, çiğ süt ve süt ürünlerinin tüketimi gibi birçok faktör *Salmonella* enfeksiyonlarının kaynağı olabilmektedir (Karshima ve ark. 2013, El-baz ve ark. 2017). İnek ve manda sütlerinde *Salmonella* spp. varlığı ile ilgili çalışmalar Tablo 2'de özetlenmiştir.



Şekil 1. *Salmonella* spp. pozitif örneklerin PCR sonuçları. I: Pozitif Kontrol, II ve III: Manda Sütünden İzole Edilen *Salmonella* spp.

Figure 1. PCR results of *Salmonella* spp. positive samples. I: Positive Control, II and III: *Salmonella* spp. Isolated From Buffalo Milk.

Tablo 2. İnek ve manda süt örneklerinde *Salmonella* spp. kontaminasyon düzeyi

Table 2. *Salmonella* spp. contamination level of cow and buffalo milk samples

Ülke	Örnek Sayısı	Bulunma Sıklığı	Kaynak
Türkiye	100	% 1	Soyutemiz ve ark. 2000
Türkiye	350	% 0	Issa ve ark. 2010
Türkiye	66	% 0	Ekici ve ark. 2004
ABD	854	%11,8	Karns ve ark. 2005
ABD	268	% 2,24	Murinda ve ark. 2002
ABD	138	%0	D'amico ve ark. 2008
ABD	131	% 6,1	Jayarao ve Henning 2001
Malezya	930	% 1,4	Chye ve ark. 2004
Mısır	50	% 50	İbrahim ve ark. 2015
Mısır	100	%22	Gwida ve Al-Ashmawy. 2014
Mısır	50	%18	El-Baz ve ark. 2017
Mısır	480	%2,5	Ahmed ve Shimamoto 2014
Romanya	42	%0	Coroian ve ark. 2010
Romanya	22	%0	Aurelia ve ark. 2009
Nijerya	600	% 8,7	Karshima ve ark. 2013
İngiltere ve Galler	1673	% 0, 36	O'Donnel 1995

Yapılan literatür taramaları sonucunda Türkiye’de manda sütlerinde *Salmonella* spp varlığı ile ilgili bir araştırmaya rastlanmamış olup, yapılan çalışmalarda inek sütü örneklerinin *Salmonella* spp. ile kontaminasyon oranları %0 ile %1 arasında olduğu saptanmıştır (Soyutemiz ve ark. 2000, Ekici ve ark. 2004, Issa ve ark. 2010). Diğer ülkelerde yapılan çalışmalarda ise inek ve manda süt örneklerinin %0 ile %50 arasında *Salmonella* spp. ile kontamine olduğu bildirilmiştir (O'Donnel 1995, Jayarao ve Henning 2001, Murinda ve ark. 2002, Chye ve ark. 2004, Karns ve ark. 2005, D'amico ve ark. 2008, Aurelia ve ark. 2009, Coroian ve ark. 2010, Karshima ve ark. 2013, Gwida ve Al-Ashmawy 2014, Ahmed ve Shimamoto, 2014, İbrahim ve ark. 2015, El-Baz ve ark. 2017). Çalışmamızdan elde edilen bulgular Türkiye’de ve diğer ülkelerde bu konu ile ilgili bildirilen oranlar arasında yer almaktadır. Soyutemiz ve ark. (2000) Batı Anadolu bölgesinde çiğ sütlerin *Salmonella* spp. kontaminasyon düzeyini %1 olarak belirlemişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada, İstanbul’daki beş farklı çiftlikten toplanan 350 adet çiğ süt örneğinde *Salmonella* spp. saptanmamıştır (Issa ve ark. 2010). Ekici ve ark. (2004) koyun, keçi ve inek sütlerinde patojen mikroorganizma varlığını araştırdıkları çalışmada benzer şekilde 66 süt örneğinin hiç birinde *Salmonella* spp. saptamadıklarını bildirmişlerdir. Bununla birlikte diğer ülkelerde, inek sütlerinde *Salmonella* varlığı ile ilgili yapılan birçok çalışma olmasına rağmen manda sütünde *Salmonella* varlığını araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Ahmed ve Shimamoto (2014) yapmış oldukları çalışmada 240 manda ve 240 inek sütü olmak üzere toplam 480 çiğ süt örneğini *Salmonella* varlığı yönünden incelemiş ve manda sütlerinin kontaminasyon düzeyini %3,3 olarak saptarken, inek sütlerinin kontaminasyon düzeyi %1,6 olarak saptamışlardır. Coroian ve ark. (2010) yapmış oldukları çalışmada inceledikleri 42 manda sütü örneğinin hiçbirinde *Salmonella* saptamamıştır. Benzer şekilde, Aurelia ve ark (2009) mevsimsel olarak inceledikleri manda sütü örneklerinde *Salmonella* spp. tespit etmediklerini bildirmişlerdir. Amerika Birleşik Devletlerinde yapılan 854 çiftlik işletmesinin dahil edildiği tank sütlerinde *Salmonella enterica* varlığı araştırılmış olup, klasik kültür metoduna göre kontaminasyon düzeyi %2,6 belirlenmiştir (Karns ve ark. 2005). Yine Amerika’da yapılan başka bir çalışmada incelenen 268 tank sütü örneğinin *Salmonella* kontaminasyon düzeyi %2,24 olarak belirlenmiştir (Murinda ve ark. 2002). Güney Dakota ve Batı Minnesota yapılan bir çalışmada 131 tank sütü örneğinin %6,1 oranında *Salmonella* spp. ile kontamine olduğu belirtilmiştir (Jayarao ve Henning 2001). Mısır’da gerçekleştirilen bir çalışmada 25 tank sütü ve 25 markette satılan çiğ süt olmak üzere toplam 50 çiğ süt numunesi *Salmonella* varlığı

yönünden incelenmiş olup, tank sütlerindeki kontaminasyon oranı %12 olarak belirlenirken, markette satılan çiğ sütlerdeki kontaminasyon oranı %24 olarak saptanmıştır (El-baz ve ark. 2017). Mısır’da gerçekleştirilen başka bir çalışmada, 50 tank sütü ve 50 markette satılan çiğ süt örneklerinin *Salmonella* kontaminasyon düzeyleri PCR tekniği ve klasik kültür metodu karşılaştırılarak değerlendirilmiş olup, klasik kültür metoduna göre, markette satılan çiğ süt örneklerinin kontaminasyon düzeyi %8 olarak belirlenirken, PCR tekniğine göre bu oran %20 olarak saptanmıştır. Tank sütü örnekleri incelendiğinde ise klasik kültür metoduna göre *Salmonella* kontaminasyonu belirlenemezken, aynı örnekler için kontaminasyon düzeyi PCR ile %24 olarak belirlenmiştir. Tüm örnekler değerlendirildiğinde PCR tekniğine göre kontaminasyon düzeyi %22 olarak saptanmıştır (Gwida ve Al-Ashmawy 2014). Malezya’da yapılan bir çalışmada 930 çiğ süt örneğinde, *Salmonella* kontaminasyon düzeyi %1,4 olarak belirlenmiştir (Chye ve ark. 2004). İbrahim ve ark. (2015) ticari süt ve süt ürünlerinin mikrobiyolojik kalitesini araştırdıkları bir çalışmada, Kahire pazarlarından topladıkları 50 çiğ süt örneğinin %50 oranında *Salmonella* spp. ile kontamine olduğunu belirlemişlerdir. O'donnell (1995) İngiltere ve Galler’de 15 aylık bir periyotta toplam 1673 tank sütü örneğini *Salmonella* spp. varlığı yönünden incelemiş ve kontaminasyon düzeyini %0,36 olarak bildirmiştir. Nijerya’da yapılan bir çalışmada toplam 600 süt örneği *Salmonella* varlığı açısından klasik kültür metodu kullanılarak incelenmiş ve kontaminasyon düzeyi %8,7 olarak belirlenmiştir (Karshima ve ark. 2013).

Dünyada ve Türkiye’de süt örneklerindeki *Salmonella* varlığını araştıran çalışmaların sonuçları değişiklik göstermektedir. Bu değişikliklere coğrafyadaki farklılıklar, örnek sayısı, farklı örnek alma prosedürleri, kullanılan analiz yöntemi neden olabilmektedir.

Sonuç olarak, çalışmadan elde edilen verilere göre Afyonkarahisar’da toplanan çiğ manda sütlerinde *Salmonella* spp.’nin yaygın olarak bulunmadığı tespit edilmiştir. Fakat, bu gıda patojenin halk sağlığı açısından oluşturabileceği riskler ve sebep olabileceği ekonomik kayıplar göz önünde bulundurulduğunda, ilgili kurumlar tarafından denetim ve kontrolün etkin olarak yapılması önem arz etmekte olup, bu gıda patojenin eliminasyonunda pastörizasyon işleminin önemli rol oynadığının göz ardı edilmemesi, süt işletmelerinde çalışan personelin bu konuda bilgilendirilmesi ve işletmelerde hijyen ve sanitasyon kurallarına uyulması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Ahmed AM, Shimamoto T.** Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Shigella* spp. from meat and dairy products in Egypt. *Int J Food Microbiol.* 2014; 168: 57-62.
- Amarjit SN, Toshihiko N.** Role of buffalo in the socioeconomic development of rural Asia: Current status and future prospectus. *Animal Sci. J.* 2003; 74: 443-445.
- Anonim 2002.** Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs-Horizontal Method for the Detection of *Salmonella* spp., International Standard, ISO (International Standardization Organization) 6579: 2002, Geneva, Switzerland Switzerland.
- Anonim 2011. European Food Safety Authority (EFSA):** The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2009. *EFSA J.* 2011; 9: 2090-2477.
- Anonim 2018.** TÜİK, bölgesel istatistikler, <https://biruni.tuik.gov.tr/bolgeselistatistik/tabloYilSutunGetir.do?durum=acKapa&menuNo=191&altMenuGoster=1>, Erişim Tarihi: 02.04.2018.
- Aurelia, P., Cristian, C., Camelia, R., Vioara, M., Gheorghe, M.** The study of the main parameters quality of buffalo milk. *Afr. J. Microbiol. Res.* 10, 201–206 (2009)
- Beale DJ, Morrison PD, Palombo EA.** Detection of *Listeria* in milk using non-targeted metabolic profiling of *Listeria monocytogenes*: a proof-of-concept application. *Food Control.* 2014; 42: 343-346.
- Chye FY, Abdullah A, Ayob MK.** Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Food microbiol.* 2004; 21(5), 535-541.
- Coroian A, Coroian CO, Vodnar DC, Trif M.** Study of the main microbiological traits in Romanian buffalo milk. *HVM Int. J. Bioflux Soc.* 2010; 2(2): 92-98
- D'amico DJ, Groves E, Donnelly CW.** Low incidence of foodborne pathogens of concern in raw milk utilized for farmstead cheese production. *Journal of Food Protection.* 2008; 71(8): 1580-1589.
- Ekici K, Bozkurt H, İslayıcı O.** Isolation of some pathogens from raw milk of different milch animals. *Pakistan J Nutr.* 2004; 3(3): 161-162.
- El-Baz A, El-Sherbini M, Abdelkhalek A, Al-Ashmawy M.** Prevalence and molecular characterization of *Salmonella* serovars in milk and cheese in Mansoura city, Egypt. *J. Adv. Vet. Anim. Res.* 2017;4(1): 45–51.
- Finstad S, O'bryan CA, Marcy JA, Crandall PG, Ricke SC.** *Salmonella* and broiler processing in the United States: Relationship to foodborne salmonellosis. *Food Res Int.* 2012; 45: 789-794.
- Gwida MM, AL-Ashmawy MA.** (2014). Culture versus PCR for *Salmonella* species identification in some dairy products and dairy handlers with special concern to its zoonotic importance. *Veterinary medicine international*, 2014; 2014: 5, Article ID 502370.
- Han BZ, Meng Y, Li M, Yang YX, Ren FZ, Zeng QK, Nout MR.** A survey on the microbiological and chemical composition of buffalo milk in China. *Food Control.* 2007; 18(6): 742-746.
- Haug A, Høstmark AT, Harstad OM.** Bovine milk in human nutrition—a review. *Lipids in health and disease.* 2007; 6(1): 25.
- Ibrahim GA, Sharaf OM, El-khalek ABA.** Microbiological Quality of Commercial Raw Milk , Domiati Cheese and Kareish Cheese. *Middle East J. Appl. Sci.* 2015;5(1): 171–6.
- Issa G, Kahraman T, Kahraman B.** Prevalence of *Listeria monocytogenes* , *Salmonella* spp . and *Escherichia coli* O157 : H7 in Raw Milk. *İstanbul Üniversitesi Vet. Fakültesi Derg.* 2010;36(1): 57–63.
- Jayarao BM, Henning DR.** Prevalence of Foodborne Pathogens in Bulk Tank Milk1. *Journal of Dairy Science.* 2001; 84(10): 2157-2162.
- Kahraman T, Ozmen G, Ozinan B, Omer Goksoy E.** Prevalence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in different cheese types produced in Turkey. *British Food Journal.* 2010; 112(11): 1230-1236.
- Kalendar R, Lee D, Schulman AH.** FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search. *Genes. Genomes and Genomics.* 2009; 3(1): 1-14.
- Karns JS, Van Kessel JS, McCluskey BJ, Perdue ML.** Prevalence of *Salmonella enterica* in Bulk Tank Milk from US Dairies as Determined by Polymerase Chain Reaction. *J. Dairy Sci.* 2005;88(10): 3475–9.

Karshima NS, Pam VA, Bata SI, Dung PA and Paman ND. Isolation of Salmonella species from milk and locally processed milk products traded for human consumption and associated risk factors in Kanam, Plateau State, Nigeria Journal of Animal Production Advances. 2013; 3(3): 69-74.

Kaynar P. Ülkemiz peynirleri üzerine mikrobiyolojik araştırmalar. Türk Mikrobiyol. Cemiy. Derg. 2011; 41(1), 1-8.

Lejeule JT, Rajala-Schultz P. Unpasteurized milk: A continued public threat. Food Safety. 2009; 48: 93-100.

Murinda SE, Nguyen LT, Ivey SJ, Gillespie BE, Almeida RA, Draughon FA, Oliver SP. Molecular characterization of Salmonella spp. isolated from bulk tank milk and cull dairy cow fecal samples. Journal of food protection, 2002; 65(7): 1100-1105.

O'Donnell ET. The incidence of Salmonella and Listeria in raw milk from farm bulk tanks in England and Wales. International Journal of Dairy Technology. 1995; 48(1): 25-29.

Sağlam D, şeker E. Gıda Kaynaklı Bakteriyel Patojenler. Kocatepe Veteriner Dergisi. 2016; 9(2): 105-113.

Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. Emerging Infectious Diseases. 2011; 17: 7-15.

Soyutemiz E, Cetinkaya F, Ozakın C, Gedikoglu S. Batı Anadolu bölgesi çiğ sütlerinde bulunan koliform bakterilerin identifikasyonu ile Escherichia coli O157:H7 ve Salmonella varlığının araştırılması. Bursa Devlet Hastanesi Bülteni. 2000; 16 (1): 5-8.

şahan Ö, Aral EM, Aden MMA, Aksoy A, Yılmaz Ö, Jahed R, Akan M. Türkiye'deki broyler tavuk şletmelerinden izole edilen Salmonella serovarlarının antimikrobiyel direnç durumu. Ankara Univ. Vet. Fak. Derg. 2016;63(1): 1-6.

Tekinşen OC. Süt Ürünleri Teknolojisi 3. Baskı Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, 2000.

Yıldırım T, Sırken B, Yavuz C. Sığır kıyma ve köftelerinde Salmonella spp. varlığı. Veteriner Hekimler Derneği Dergisi. 2016; 87(1): 11-23.

Yuan Y, Xu W, Zhai Z, Shi H, Luo Y, Chen Y, Huang K. Universal Primer-Multiplex PCR Approach for Simultaneous Detection of Escherichia coli, Listeria monocytogenes, and

Salmonella spp. in Food Samples. Journal of Food Science. 2009; 74: 8.

Effects of Subclinical and Clinical Ketosis on The Incidence of Mastitis, Metritis, Culling Rate and Some Hematological Parameters in Dairy Cows

Cangir UYARLAR^{1*}, İbrahim Sadi ÇETİNGÜL¹, Eyüp Eren GÜLTEPE¹,
Abdur Rahman SİAL², İsmail BAYRAM¹

¹Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları A.D. Afyonkarahisar, Türkiye

²University of Veterinary and Animal Sciences, Lahore, Pakistan

*Corresponding author e-mail: cuyarlar@aku.edu.tr

ABSTRACT

The study was conducted on 197 milk dairy cattle randomly selected from 950 breeding dairy cattle. These animals were monitored immediately after delivery and blood count and serum BHBA analyzes were performed weekly for the first 8 weeks. According to the results of the BHBA obtained, all animals in the study were divided into three groups as follows; a) Control Group "C"; serum BHBA levels below 1.2 mmol/l during the study b) Subclinical Ketosis Group "SK"; serum BHBA levels between 1.2 and 2.9 mmol/l c) Clinical Ketosis Group "CK"; serum BHBA levels were above 2.9 mmol/l. All performance parameters such as milk yield and reproductive efficacy obtained from the herd management program (Dairy Plan, Gea / Germany). TLS, LS, NS, MS levels were found to be higher in the SK and CK compared to the C. Especially, a strong positive interaction between TLS and blood BHBA level was determined (P <0,000). In addition, the incidence of mastitis, metritis and coexistence of these two infections was significantly higher in the SK and CK than in the C (p <0,013). Furthermore, the rate of culling was significantly higher in the SK and CK than C and it was also observed that this ratio increased in parallel with the severity of the ketosis (p <0.008). These findings show that hematologic parameters change significantly in animals that have undergone clinical or subclinical ketosis and that susceptibility to significant infectious diseases during the periparturient period such as mastitis and metritis increases and as a result, the rate of culling increases.

Keywords: Ketozis, Mastitis, Metritis, Culling Rate, Dairy Cows

Süt İneklerinde Görülen Subklinik ve Klinik Ketozisin Bazı Hematolojik Parametreler, Mastitis, Metritis İnsidensleri ile Sürü Dışı Kalma Oranına Etkileri

ÖZ

Bu çalışma 950 adet süt sığırı içerisinde rastgele seçilen 197 adet süt sığırı üzerinde yürütülmüştür. Hayvanlar doğum yaptıkları günden itibaren takibe alınmış olup ilk 8 hafta boyunca kan sayımı ve serum BHBA analizleri haftalık olarak yapılmıştır. Elde edilen BHBA sonuçlarına göre çalışmadaki tüm hayvanlar aşağıdaki şekilde üç gruba ayrılmıştır; a) Kontrol Grubu "K"; çalışma boyunca serum BHBA seviyesi 1.2 mmol/l'nin altında seyredenler b) Subklinik Ketozis Grubu "SK"; serum BHBA seviyesi 1.2 ile 2.9 mmol/l arasında seyredenler c) Klinik Ketozis Grubu "KK"; serum BHBA seviyesi 2.9 mmol/l'nin üzerinde seyredenler. Çalışmada kullanılan tüm parametreler sürü yönetim programından (Dairy Plan, Gea, Westfalia/Almanya) alınmıştır. Çalışmada kullanılan tüm hayvanlar aynı rasyonla beslenmiş olup hiçbir hayvana özel bir koşul uygulanmamıştır. Yapılan analizler sonrasında TLS, LS ve NS'nin en yüksek olduğu grup KK, en düşük olduğu grup K olarak tespit edilmiştir. Özellikle TLS ve BHBA seviyeleri arasında güçlü bir ilişki tespit edilmiştir (p<0,000). Bununla birlikte hem mastitis hem metritis hem de bu iki enfeksiyonun birlikte seyretme insidensi subklinik ve klinik ketozis gruplarında kontrol grubuna göre çok yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte subklinik ve klinik ketozis geçiren hayvanlarda sürü dışı bırakma oranı kontrol grubuna göre çok daha yüksek bulunmuş aynı zamanda ketozisin şiddetinin artması ile bu oranının da doğru orantılı bir şekilde yükseldiği görülmüştür. Bu bulgular göstermektedir ki gerek klinik gerekse subklinik ketozis geçiren hayvanlarda hematolojik parametreler ciddi oranda değişmekte, mastitis ve metritis gibi periparturient dönemin önemli enfeksiyöz hastalıklarına yatkınlık artmakta ve tüm bunların bir sonucu olarak sürü dışı kalma oranı yükselmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ketozis, Mastitis, Metritis, Sürü Dışı Bırakma Oranı, Süt Sığırı

To cite this article: Uyarlar C. Çetingül İ.S. Gültepe E.E. Sial A.R. Bayram İ. Effects of Subclinical and Clinical Ketosis on The Incidence of Mastitis, Metritis, Culling Rate and Some Hematological Parameters in Dairy Cows. *Kocatepe Vet J.* (2018) 11(2): 186-193.

INTRODUCTION

Ketosis is a metabolic disease characterized by the excessive increase of acetoneacetic acid (AcAc), betahydroxybutyric acid (BHBA) and acetone (Ac) concentrations which are ketone bodies in tissues and fluids. This disease is extremely important for dairy cattle production. The reason is that it is common, it develops insidiously and causes major economic losses (Ketoglu and Bařoglu, 2004).

Ketosis develops when the liver metabolism can not respond adequately to the gluconeogenesis need which has increased due to the influence of the negative energy balance that occurs when the energy expenditure in the organism is higher than the dietary energy intake. The oxaloacetate pool, one of the most important factors determining the capacity of gluconeogenesis in the liver, is depleted, fatty acids can not be completely oxidized and are converted into ketone bodies and released into the blood. Thus, the ketone level rises in all fluids such as blood, milk, saliva and so on (Baird et al., 1968).

Milk production is the primary cause for the ketosis that leads to the exacerbation of the negative energy balance in dairy cows (Grummer, 1993). The rapid rise in milk production after birth triggers and exacerbates the energy deficit associated with feed consumption which is too low to meet metabolic needs yet. In response to this, the fat stores rapidly break down and are released into the blood in the form of Non-Esterified Fatty Acid (NEFA) and delivered to the liver. The liver is unable to fully oxidize fatty acids due to the exhausted oxaloacetate reserve, uses some of it for gluconeogenesis and glucose production, stores some of it in its own cells and returns some of it back into the blood by converting it into ketone bodies. As this vicious cycle continues, fat accumulation and ketone production in the liver continues to increase, resulting in major metabolic diseases which have negative impact on both the yield and the health of the animal (Overton and Waldron, 2004).

The elevation NEFA level in blood is the most important indicator of the negative energy balance, which is the prognostic factor for ketosis. The plasma concentration of NEFA doubles between 17 days before birth and 2 days before birth and doubles again on the day of delivery to reach peak levels. There are many reasons that trigger the onset of NEFA concentration in blood. The most common of these is the initiation of fat mobilization from the adipose tissue to meet the energy needs of fetal and maternal tissues growing towards the end of the dry period (Sandra et al., 1992, Grummer, 1993). Therefore, the basis for

conditions that lead the animal to ketosis is laid before parturition and the animal gives birth predisposed to metabolic diseases.

The most important indicator of ketosis is the rise of the BHBA (Betahydroxybutyrate Acid) level, which is one of the ketone bodies in blood. However, there is no clear number of what this level is. Some researchers (Nielen et al., 1994; Enjalbert et al., 2001) described subclinical ketosis as a blood BHBA level of 1.00 to 1.4 mmol / L, whereas Andersson (1988) describes subclinical ketosis only when the hyperketonemia tabulation is above 1.2 mmol/l. Oetzel (2004), who is one of the most important names with current studies in this issue, defines clinical ketosis when the ketone level in blood is in excess of 3 mmol/l and subclinical ketosis when the ketone level in blood is over 1,2 mmol/l.

The subclinical course of ketosis is more dangerous than the clinical course. The diagnosis of clinical ketosis can be made quickly and precisely. The subclinical course is clandestine and insidious, often without any symptoms, coincides with other diseases that cause the animal to lose its economic value and is often unrecognizable even during this period. (Oetzel, 2004). Therefore, while ketosis on its own is an important metabolic disorder for dairy cattle it becomes much more dangerous when it forms a complex tableau with other diseases. Correa et al. (1993) clearly demonstrate a link between clinical ketosis formation in dairy cows and diseases such as metritis, abomasum displacement and mastitis. Furthermore, some researchers (Dohoo and Martin, 1984; Whitaker et al., 1993) report that subclinical ketosis is associated with decreased milk yield, increased risk of diseases such as clinical ketosis, metritis, cystic ovaries, reduced reproductive performance and other disorders. As a result of these diseases and disorders that come together, the animals lose their economic value and are ostracized from the herd. The aim of this study is to reveal the relationship between clinical and subclinical ketosis and mastitis, metritis and culling rate from the herd in dairy cattle.

MATERIAL and METHOD

Study Population

This study has been carried out using records belonging to animals raised in Niętař Agricultural Enterprises operating in Niğde. The veterinarians in the enterprise record the health, milk and reproductive trait parameters of the animals and the laboratory results on a daily follow up program (Dairy Plan, Gea / Westfalia, Germany). Thus, it is possible to access individual past information of all animals in the herd when necessary. All animals on

the farm are grouped according to milk yield levels and are housed in separate paddocks. The dry period is divided into 2, the animals are housed in the first section (early dry period) for 41 days and the second section (last period) until delivery. In addition, all postnatal animals are housed in the "early lactation" group during the first 30 days of lactation, regardless of milk production. Details of the rations for all these periods are explained in detail in Table 1. The ration was prepared as TR (Full Ration) for the animals and served *ad libitum*. Thus surplus feed in all groups were collected daily, weighed and recorded. This way feed consumption was determined and taken under control on a group basis. All feed raw materials used in the rations and TR samples taken weekly were transported in a cold chain to Afyon Kocatepe University Veterinary Faculty, Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases Laboratory and analyzed for crude oil, crude protein, crude ash, dry matter according to Weende Analysis Methods (AOAC, Williams, 1984), for ADF (Acid Detergent Fiber and NDF (Neutral Detergent Fiber) according to Georing Van Soest (1970). The nutrient levels of feedstuffs were calculated according to the obtained results and these analysis results were used in ration formation.

Study Design and Data Collection

All the animals on the farm are checked over by the responsible veterinarian on duty at least once per day, treatment is started immediately when disease is diagnosed. A small laboratory on the farm is used to finalize diagnosis. This laboratory is equipped with small scale equipment such as a centrifuge, hemogram, device for monitoring blood gases and Elisa reader. When detailed analysis is needed, such samples are dispatched to private laboratories in the region and to the Laboratory of Afyon Kocatepe University Veterinary Faculty, Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases. The records of the animals that have undergone metabolic or infectious disease during the delivery period are evaluated in a separate perspective by the farm management, animals that have been unable to conceive in spite of all the ovary synchronization and artificial insemination during the first 200 days of lactation and whose milk yield is below 10 l/day are excluded from the herd. Thus, the culling criteria used in our study establishes the same perspective.

All animals used in the study were randomly selected from among animals that had only been diagnosed with ketosis, mastitis or metritis and had not had any other illnesses, had a single live birth (delivered a single calf) in a healthy manner without aborting or difficulty and had been dispatched to the 'high yield group' for producing at least 40 l of

milk per day after early lactation and were housed in this section for at least 200 days. Accordingly, 197 dairy cows were used as animal material. These animals were monitored by us from the day they delivered and their blood serum and serum BHBA analyzes were performed weekly for the first 8 weeks. Hemogram analysis was carried out with the Mindray BT2800 brand and model device in the enterprise and relevant kits available while the BHBA analyzes were also performed using the relevant kits (Randox, UK) with the Biotek brand spectrophotometric reading device available at the enterprise. All the animals in the study were divided into three groups in line with the report of Oetzel (2004) in accordance to the obtained BHBA results;

- a) Control Group; those with serum BHBA levels below 1.2 mmol / l during the study
- b) Subclinical Ketosis Group; serum BHBA levels ranging from 1.2 to 2.9 mmol / l
- c) Clinical Ketosis Group; serum BHBA levels over 2.9 mmol / l.

Statistical Analyses

The model assumptions of normality and homogeneity of variance were examined by Shapiro-Wilk and Levene test, respectively. The statistical analysis was performed with MedCalc (MedCalc Software bvba, Oostend, Belgium, v.18). Log transformation was performed for some data group. For hematology values (continuous variable), One Way ANOVA was used for group comparison followed by Tukey-Kramer for post-hoc. Also, Pearson's chi-square test selected to determine the relationship between two variables for categorical variables (culling rates and incidences of diseases). The level of significance was determined as $p < 0.05$ and values are expressed as $\bar{X} \pm SEM$ on tables.

RESULTS

According to the hemogram results examined in the study the number of Total Leukocytes (TLS), Number of Lymphocytes (LS), Number of Neutrophils (NS) and Monocyte counts were found to be higher in the animals with clinical and subclinical ketosis compared to the control group and especially TLS increased in accordance with BHBA (Table 2.). This data shows that monitoring blood hemogram parameters during the natal period can help identify metabolic functions as well as detect infectious diseases and can be used as a method to help measure blood BHBA levels in ketosis diagnosis. It is clear that both metritis and mastitis incidence significantly increased in animals exposed to subclinical and clinical ketosis compared to the animals in the control group (Table 3). However, no significant difference was

detected between these two disease courses. However, the rate of culling increased significantly in animals with subclinical and clinical ketosis. As a result, the productive life expectancy of animals that have undergone ketosis during the natal period is shortened. According to the result obtained by comparing the rate of culling among the groups, this ratio was found to be much higher in the animals that had undergone subclinical and clinical ketosis than in the control group and it was observed that this ratio increased in proportion to the severity of ketosis.

Table 1. Ingredients and Chemical Composition of The Diet

<i>Ingredients</i>	<i>(% DM)</i>
Corn Silage	30,05
Alfalfa Hay	10,89
Corn (Fine Ground)	15,78
Barley (Cracked)	6,76
Potato	2,25
Molasses	0,75
Soybean Meal (48% CP)	6,76
Sunflower Meal (36% CP)	3,01
Corn Gluten Meal	2,63
Wheat Bran	2,25
Whole Cotton Seed	6,38
Brewers Grains (22% DM)	3,08
Sugar Beet Pulp (21% DM)	2,25
DDGS (Corn)	4,51
Premix	1,87
Sodium Bicarbonate	0,56
Magnesium Oxide	0,22
<i>Chemical Analysis (% DM)</i>	
Crude Protein	16,35
Lysine (%CP)	6,35
Methionine (%CP)	2,05
NeL (mEq/100 g of DM)	1,68
Fat	4,83
Starch	26,15
NFC	35,72
NDF	32,15
ADF	16,52
Ca	1,02
P	0,44
Mg	0,32
K	1,16
Cl	0,57
Na	0,52
S	0,21

Premix contained; 21,55% Calcium; 6,35% Mg; 2,57% K; 2,95% S; 1,75% Mn; 1,50 Zn; 12000 mg/kg Fe; 2700 mg/kg Cu; 250 mg/kg I; 250 mg/kg Co; 105 mg/kg Se; 275000 IU/kg Vit.A; 120000 IU/kg Vit.D and 750 IU/kg Vit.E

DISCUSSION

Although there are very limited epidemiological studies regarding ketosis there are many studies about hyperketonemia or hyperkeratosis (Duffield, 2000). The underlying reason for this is that clinical symptoms that distinguish subclinical and clinical ketosis from each other are not fully known (Andersson, 1988). The time frame that should be focused to determine hyperketonemia is the first two months after delivery. This period is the primary risk period (Baird, 1982)). Dohoo and Martin (1984a) divided this period into two and compared the first month with the second month, and reported that the peak prevalence for hyperketonemia was the 3rd and 4th weeks after delivery. There are other studies reporting this finding (Andersson and Emanuelson, 1985, Kauppinen, 1983, Simensen et al., 1990). However, there are also studies reporting hyperketonemia peaking during the first two weeks which may be considered as the early period (Duffield et al., 1997b; Duffield et al., 1998). The reason for this early peak may be that genetic advances and mishaps in the feeding management may cause severe negative energy balance in animals approaching delivery (Duffield, 2000). A number of studies (Kauppinen, 1983; Andersson, 1988; Nielen et al., 1994, Duffield et al., 1997a) report the incidence of hyperketonemia in dairy cows within the first two months after delivery as ranging from 8.9% to 34%. Dohoo and Martin (1984a) reported that this incidence varied between 12.1% and 100%, depending on the severity of the negative energy balance and the time interval at which it was effective. In this study, the incidence of subclinical ketosis was 36.54% and the incidence of clinical ketosis was found to be 12.69%. Of course, it is natural to get different results in the studies mentioned. The range of measurements made during studies is extremely variable. For example in the study carried out by Duffield, 2000 the time interval between milk ketone tests was 30 days in 8 enterprises and 90 days in 24 enterprises. In this study, measurements were made for 8 weeks after delivery. As Duffield (2000) reported, it is very difficult to obtain a realistic hyperketonemia or subclinical ketosis prevalence, since measurement times and durations vary among studies.

Although there are many studies indicating the relationship between ketosis and many diseases, the number of diseases that indicate the association between ketosis and the periparturient period is very low (Duffield, 2000). In this study, there was a significant positive correlation between clinical and subclinical ketosis and metritis. Many studies (Suthar et al., 2013; Dohoo and Martin, 1984b; Huzzey et al., 2007; Duffield et al., 2009) conclude

that there is a positive link between hyperketonemia and metritis in a manner consistent with this finding. According to Huzzey et al. (2007) the main reason for this link is the reduction in feed consumption starting at 1 or 2 weeks of delivery. In this case, the circulation of NEFA level (Duffield et al., 2009; Ospina et al., 2010; Chapinal et al., 2011) and BHBA level (LeBlanc et al., 2005; Santos and LeBlanc, 2011), which is an important risk factor for metritis increases in the blood. Several studies report that the decrease in the levels of glucose utilization from tissues, the increase in NEFA and BHBA levels either suppress or negatively affect the immunological system in many ways (Hammon et

al., 2006; Scalia et al., 2006; 2012). Furthermore, Hammon et al. (2006) reported a significant association between puerperal metritis due to inadequate neutrophil function in immunosuppression induced by these or similar causes. Neutrophil function needs to work in a robust way in order to be able to protect the uterus with the local immune system which is open to external infection when the bond between mother and calf is severed and expelled after delivery. Otherwise, the uterus will become more susceptible and vulnerable to infection. Immunosuppression in the form of hyperketonemia paves the way for this.

Table 2. Effects of Ketosis on Blood Parameters

GRUPLAR	TL	LS	NS	MS	BHBA
C	8,99±0,07 ^C	4,09±0,05 ^A	3,16±0,05 ^A	0,365±0,001 ^B	0,498±0,027 ^A
SK	11,01±0,21 ^B	3,66±0,01 ^B	4,66±0,02 ^B	0,504±0,013 ^A	1,971±0,045 ^B
CK	12,13±0,19 ^A	3,66±0,02 ^B	5,13±0,11 ^C	0,523±0,023 ^A	3,484±0,059 ^C
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

C (Control), SK (Subclinical Ketosis), CK (Clinical Ketosis)

Table 3. Effects of Ketosis on The Incidence of Disorders

GROUPS	H	ME	MA	ME+MA
C	86 (%86,0)	10 (%10,0)	3 (%3,0)	1 (%1)
SK	47 (%65,3)	18 (%25,0)	3 (%4,2)	4 (%5,6)
CK	15 (%60,0)	6 (%24,0)	1 (%4,0)	3 (%12,0)

Pearson Ki-Kare testi p=0,013

C (Control), SK (Subclinical Ketosis), CK (Clinical Ketosis)

H (Healthy), ME (Metritis), MA (Mastitis), ME+MA (Both of Metritis and Mastitis)

Table 4. Effects of Ketosis on Culling Rate

GROUPS	NO	YES
C	88 (%88,0)	12 (%12,0)
SK	53 (%73,6)	19 (%26,4)
CK	16 (%64,0)	9 (%36,0)

Pearson Ki-Kare testi p=0,008

C (Control), SK (Subclinical Ketosis), CK (Clinical Ketosis)

Likewise a strong association between positive subclinical and clinical ketosis and mastitis was observed in this study. The other tissue that is affected in the same way as the uterus in the case of immunosuppression is udder tissue. Both local and systemic immunity need to be strong in order to protect udder tissue from infection. However,

Duffield et al. (2009) and Suthar et al. (2013) did not establish a link between subclinical ketosis and mastitis. The researchers attributed the cause of this to the fact that no animal had clinical mastitis form within 15 days after delivery. In other words, since the animals were not infected or metabolically followed by the researchers, information about the

days of lactation were not available. On the other hand, there are two important studies manifesting this association. According to the results of a study conducted by Grohn et al. (1989), the susceptibility of Ayrshire breed cows infected with mastitis to get ketosis is increasing. Kremer et al. (1993) reported that animals with BHBA levels above 1.4 mmol / L were more severely affected with experimental mastitis in comparison with normal animals. The main reason behind the association between mastitis and ketosis is the repressive effect of ketone bodies on white blood cells (White et al., 1968). According to Duffield (2000) negative energy balance and related subclinical ketosis have negative effects on some important immune functions. Furthermore, according to Duffield et al., (1999) the application of monensin as a

controlled release to postpartum dairy cattle reduces the risk of multiple diseases in animals. According to Duffield (2000) the positive effect of monensin on energy metabolism also helps to regulate immune functions. However, researchers have reported that more work should be done in this area to try to clarify the matter. In addition to these, there are studies that report that mastitis is not directly related to negative energy balance and associated immunosuppression and that negative environmental conditions are more effective in the formation of mastitis (Ruegg, 2003; Kahn and Line, 2010) and that immunosuppression caused by ketosis only increases the severity of the disease Drackley, 1999, Suriyasathaporn et al., 2000, LeBlanc 2010).

In this study, a strong positive correlation between the rate of culling and subclinical and clinical ketosis has been determined. The main criteria for culling in the enterprise where the study was carried out are the same as they are in many modern farms all over the world where dairy cattle breeding is carried out is chronic, persistent or recurrent diseases, old age or the end of its productive life of the animal, low milk yield, and most importantly the inability to conceive. For reasons other than natural causes such as old age, the exclusion of any animals from the herd has a significant negative impact on the economic dynamics of the enterprise. In this study, subclinical or clinical ketosis increased the rate of mastitis and metritis, two important and persistent diseases, due to the reasons described above, which led to severe fertility problems. As a result, the rate of culling was significantly increased. To examine the causes of adverse effects of hyperketonemia on reproductive efficiency; Butler et al. (1989) reported that the first ovulation after calving is delayed if the degree of negative energy balance increases in dairy cattle during the early lactation period. According to the researchers, this delay

reduces the pregnancy rate in the first insemination because the impregnation success is related to the number of cycles of the ovulation cycle that takes place until the insemination (Stevenson and Call, 1983; Whirmore et al., 1974). Hyperketonemia is an indication of energy metabolism that has been impaired due to severe negative energy balance, therefore it is unavoidable that defects in energy metabolism will affect reproductive efficiency adversely (Duffield, 2000). However, it has been determined that the first postnatal insemination or postnatal insemination interval increases in herds with increased incidence of hyperketonemia (Andersson and Emanuelson, 1985). Furthermore, there is also a strong association between subclinical ketosis and ovarian cysts (Dohoo and Martin, 1984a). In hyperketonemia, milk fat is elevated, which is also observed in the case of negative energy balance (Duffield 2000). From this, Miettinen and Setälä (1993) reported that the interval between birth and conception is high in dairy cows with high milk yield and milk fat. In addition, Whitaker (1993) determined that the onset of postpartum cyclic activity in cattle without energy metabolism problems within the first 14 days postpartum was shorter. All these studies show that severe negative energy balance and hyperketonemia formed in this way affects fertility efficiency in a negative way in one way or another. Increased fertility problems due to hyperketonemia determined in this study and the consequent increase in the rate of culling are compliant with the results of the studies mentioned above.

CONCLUSION

The findings obtained in this study indicate that the immune system is affected negatively in animals with clinical ketosis as well as animal with subclinical ketosis which progresses much more insidiously than the former one and that the incidence of mastitis and metritis, the most significant and most damaging diseases of the periparturient period and as a result the productive retention times of these animals in the herd is seriously shortened. Therefore, this developing tableau leads to more profound economic challenges in countries like Turkey where the number of breeding dairy cattle is not sufficient and which are obliged to import live animals continuously from abroad. Taking all this into consideration, it will be beneficial for both the farm and the country economy to support the breeding dairy cattle metabolically before and after birth, to ensure that they deliver with a robust and strong liver performance and that they are protect from the negative effects of negative energy balance after delivery.

REFERENCES

- Andersson L:** Subclinical ketosis in dairy cows. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1988; 4:233-248.
- Andersson L, Emanuelson U:** An epidemiological study of hyperketonaemia in Swedish dairy cows; Determinants and the relation to fertility. *Preventive Veterinary Medicine* 1985; 3:449-462.
- Baird DG:** Primary ketosis in the high-producing dairy cow: Clinical and subclinical disorders, treatment, prevention and outlook. *J Dairy Sci* 1982; 65:1-10.
- Baird G. D., Hibbit K. G., Hunter G. D., ET AL.** Biochemical aspects of bovine ketosis. 1968; *Biochem. J.* 107:683.
- Başoğlu A., Sevinç M. .** Evcil Hayvanlarda Metabolik ve Endokrin Hastalıklar. Pozitif Matbaacılık. 2004 ISBN : 975-6652-23-3
- Butler WR, Smith RD:** Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. 1989; *J Dairy Sci* 72:767-783.
- Chapinal, N., M. Carson, T. F. Duffield, M. Capel, S. Godden, M. Overton, J. E. P. Santos, and S. J. LeBlanc.** The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. 2011; *J. Dairy Sci.* 94:4897–4903.
- Correa MT, Erb H, Scarlett J:** Path analysis for seven postpartum disorders of Holstein cows. 1993; *J Dairy Sci* 76:1305-1312.
- Dohoo IR, Martin SW:** Subclinical ketosis: Prevalence and associations with production and disease. 1984a; *Can J Comp Med* 48:1-5.
- Dohoo IR, Martin SW:** Disease, production and culling in Holstein-Friesian cows III: Disease and production as determinants of disease. 1984b; *Preventive Veterinary Medicine* 2:671-690.
- Drackley J. K.** Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier?. 1999 ; *J. Dairy Sci* 82:2259-2273.
- Duffield TF, Kelton DF, Leslie KE, et al:** Use of test day milk fat and milk protein to predict subclinical ketosis in 1997b; Ontario dairy cattle. *Can Vet J* 38:713-718.
- Duffield TF, Sandals D, Leslie KE, et al:** Efficacy of monensin for the prevention of subclinical ketosis in lactating dairy cows. 1998; *J Dairy Sci* 81:2866-2873.
- Duffield TF, Leslie KE, Sandals D, et al:** Effect of prepartum administration of a monensin controlled release capsule on cow health and reproductive performance. 1999; *J Dairy Sci* 82:2377-2384.
- Duffield TF:** Subclinical Ketosis in Lactating Dairy Cattle. 2000; *Metabolic Disorders of Ruminants.* 16,2: 231-253.
- Duffield, T. F., K. D. Lissemore, B. W. McBride, and K. E. Leslie.** Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. 2009; *J. Dairy Sci.* 92:571–580.
- Enjalbert F., Nicot M. C., Bayourthe C.** Ketone Bodies in Milk and Blood of Dairy Cows: Relationship between Concentrations and Utilization for Detection of Subclinical Ketosis. 2001; *J. Dairy Sci.* 84:583–589.
- Georing H.K. and Van Soest P.J.** Forage Fiber Analysis Agric. Handbook No: 379. (Agricultural Research Service) 1970; U.S.Dep. Agric. Washington, D.C.
- Grohn YT, Erb HN, McCulloch CE, et al:** Epidemiology of metabolic disorders in dairy cattle: Association among host characteristics, disease, and production. 1989 ; *J Dairy Sci* 72:1876-1885.
- Grummer R. R.,** Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. 1993; *J. Dairy Sci.* 76:3882–3896.
- Hammon, D. S., I. M. Evjen, T. R. Dhiman, J. P. Goff, and J. L. Walters..** Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. 2006; *Vet. Immunol. Immunopathol.* 113:21–29.
- Huzzey, J. M., D. M. Veira, D. M. Weary, and M. A. G. von Keyser-lingk..** Prepartum behavior and dry matter intake identify dairy cows at risk for metritis. 2007; *J. Dairy Sci.* 90:3220–3233.
- Kahn, C. M., and S. Line..** The Merck Veterinary Manual. 10th ed. Merck Sharp & Dohme Corp., a subsidiary of Merck & Co. Inc., 2010; Whitehouse Station, NJ.
- Kauppinen K:** Prevalence of bovine ketosis in relation to number and stage of lactation. 1983 ; *Acta Vet Scand* 24:349-361.
- Kremer WDJ, Noordhuizen-Stassen EN, Grommers FJ, et al:** Severity of experimental *Escherichia coli* mastitis in ketonemic and nonketonemic dairy cows. 1993; *J Dairy Sci* 76:3428- 3436.
- LeBlanc, S. J., K. E. Leslie, and T. F. Duffield.** Metabolic predictors of displaced abomasum

- in dairy cattle. 2005; *J. Dairy Sci.* 88:159–170.
- LeBlanc, S.** Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. 2010; *J. Reprod. Dev.* 56:S29–S35.
- Miettinen PVA, Setälä JJ:** Relationships between subclinical ketosis, milk production and fertility in Finnish dairy cattle. 1993; *Preventive Veterinary Medicine* 17:1-8.
- Nielen M, Aarts MGA, Jonkers GM, et al:** Evaluation of two cow-side tests for the detection of subclinical ketosis in dairy cows. 1994; *Can Vet J* 35:229-232.
- Oetzel, G. R.** Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. 2004; *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 20(3), 651-674.
- Ospina, P. A., D. V. Nydam, T. Stokol, and T. R. Overton.** Evaluation of nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. 2010; *J. Dairy Sci.* 93:546–554.
- Overton, T. R., and M. R. Waldron.** "Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health." 2004; *Journal of dairy science* 87: E105-E119.
- Ruegg, P. L.** Investigation of mastitis problems on farms. 2003; *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 19:47–73.
- Sandra J. B., Grummer R. R., Valino C. C., ET AL.** (1992). Effect of Prepartum Dry Matter Intake on Liver Triglyceride Concentration and Early Lactation. 1992; *J. Dairy Sci.* 75:1914.
- Scalia, D., N. Lacetera, U. Bernabucci, K. Demeyere, L. Duchateau, and C. Burvenich.** In vitro effects of nonesterified fatty acids on bovine neutrophils oxidative burst and viability. 2006; *J. Dairy Sci.* 89:147–154.
- Simensen E, Halse K, Gillund P, et al:** Ketosis treatment and milk yield in dairy cows related to milk acetoacetate levels. 1990; *Acta Vet Scand* 31:433-440.
- Stevenson JS, Call EP:** Influence of early estrus, ovulation, and insemination on fertility in postpartum Holstein cows. 1983; *Theriogenology* 19:367-375.
- Suriyasathaporn W., C. Heuer, E. N. Noordhuizen-Stassen, and Y. H. Schukken.** Hyperketonemia and the impairment of udder defense: A review. 2000; *Vet. Res.* 31:397–412.
- Suthar VS, Canelas-Raposo J, Deniz A, Heuwieser W;** prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows. 2013; *J. Dairy Sci.* 96: 2925-2938.
- Whitaker DA, Smith EJ, da Rosa GO, et al:** Some effects of nutrition and management on the fertility of dairy cattle. 1993; *Vet Rec* 133:61-64.
- White F, Rattray EAS:** The in vitro effect of ketone bodies on the growth curves of mastitis organisms in milk. 1968; *J Comp Pathol* 78:179-188.
- Whitmore HL, Tyler WJ, Casida LE:** Effects of early postpartum breeding in dairy cattle. 1974; *J Anim Sci* 38:339-346,
- Williams S.** AOAC, 1984; Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. ISBN:0-935584-24-2.

Gastrointestinal Helminth Infections in Dogs Detected by Stool Examination in Isparta Province

Mehmet ACIÖZ¹, Ahmet GÖKSU^{2*}, Mahmut Sinan EREZ²

¹Isparta Provincial Directorate of Food Agriculture and Livestock

²Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Parasitology

*Corresponding author e-mail: ahmetgoksu@aku.edu.tr

ABSTRACT

This study was carried out to determine the prevalence of gastrointestinal helminth infections in dogs in Isparta province according to feces examination. For this purpose, 139 owned dogs feces were examined macroscopic, then examined microscopically for helminth eggs with saturated saline flotation technique. At least one helminth species was identified in 48 of the 139 dogs (34.5%) that were observed. The most common species were *Toxocara canis* (18.7%), followed by *Ancylostoma spp.* (6.5%) *Uncinaria spp.* (6.5%), *Toxascaris leonina* (5.75%), *Taenia spp.* (3.5%). In female dogs, 1.2 times more helminth infection was detected than in males. Although the infection rate in dogs older than 1 year was 1.2 times lower than the infection rate in dogs between 0 and 1 year, there was no statistical difference ($p > 0.05$). As a consequence of this study, it has been thought that it is important to establish the existence of *Echinococcus granulosus* by using serological or molecular techniques to distinguish the *Taenia spp.* eggs. This situation is important in terms of one world, one medicine and one health, which is a new concept accepted in the world. As a result, the presence of zoonotic helminths in the dogs in the Isparta region poses a risk for human and animal health.

Keywords: Isparta, Dog, Zoonose, Helminth

Isparta İlinde Sahipli Köpeklerde Dışkı Bakısı ile Tespit Edilen Gastrointestinal Helmint Enfeksiyonları

ÖZ

Bu çalışma, Isparta yöresinde sahipli köpeklerde bulunan gastrointestinal helmint enfeksiyonlarının dışkı bakısına göre yaygınlığının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, 139 sahipli köpek dışkısı önce makroskobik olarak, daha sonra doymuş tuzlu su flotasyon tekniği ile helmint yumurtaları yönünden mikroskobik olarak incelenmiştir. Bakısı yapılan 139 köpekten 48'inde (%34.5) en az bir helmint türü tespit edilmiştir. En yaygın tür *Toxocara canis* (%18.7) olup, bunu sırasıyla *Ancylostoma spp.* (%6.5) *Uncinaria spp.* (%6.5), *Toxascaris leonina* (%5.75), *Taenia spp.* (%3.5) izlemiştir. Dişi köpeklerde erkeklere göre 1.2 kat fazla helmint enfeksiyonu belirlenmiştir. Bir yaşından büyük olan köpeklerde enfeksiyon oranı, 0 ile 1 yaş arasındaki köpeklerdeki enfeksiyon oranından 1.2 kat düşük bulunmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p > 0.05$). Sonuç olarak, Isparta yöresinde köpeklerde zoonoz karakterdeki helmintlerin varlığı, insan ve hayvan sağlığı açısından risk oluşturmaktadır.

Anahtar kelimeler: Isparta, Köpek, Zoonoz, Helmint

To cite this article: Acioz M, Goksu A, Erez M.S. Gastrointestinal Helminth Infections Detected by Stool Examination in Isparta Province. Kocatepe Vet J. (2018) 11(2): 194-198.

INTRODUCTION

Cats and dogs are animals that are directed and domesticated to live with people. Today, many families have cats or dogs in their homes or gardens. Especially in developed countries, there are many cats and dogs roaming the streets. For centuries, people have benefited from close friendship relations with dogs. Inadequate and inaccurate practices in the prevention, control, diagnosis or treatment of certain diseases increase the potential for transmission of zoonotic diseases, especially since dogs, (*Canis familiaris*) are closely related to humans and other domestic animals. Among these, parasitic infections, especially helminthic infections, are a major threat to animal and public health, as well as economic problems (Fuentes et al. 1981).

As a result of the studies carried out in street dogs and owned dogs in Turkey, the presence of helminths of cestode species such as *Diplydium*, *Taenia*, *Mesocostoides* and *Echinococcus*, nematode species such as *Toxocara*, *Toxascaris*, *Ancylostoma*, *Uncinaria*, *Trichuris* and *Spirocerca* species were determined (Orhun et al. 2006, Yaman et al. 2006, Kozan et al. 2007, Yildirim et al. 2007, Balkaya and Avcioglu 2011). Helminth species of species such as *Toxocara*, *Ancylostoma*, *Uncinaria*, *Echinococcus* are zoonotic and cause serious diseases that threaten Public Health (Macphersen et al. 2012).

In various studies made in Turkey between 19.4-100% helminth infection rates have been reported in dogs (Saygi et al. 1990, Umur and Arslan 1998, Orhun and Ayaz 2006, Kozan et al 2007, Yildirim et al. 2007, Balkaya and Avcioglu 2011, Isik et al. 2014, Gürler et al. 2015, Sayin-İpek and Koçhan 2017, Öge et al. 2017).

The aim of this study was to determine the prevalence of gastrointestinal helminth infections in dogs in Isparta region and to determine possible risk factors in terms of public health.

MATERIALS and METHODS

This study was carried out between February and May of 2017 on owned dogs hosted in the Isparta

house or garden. Dog owners were informed about the study and the age and sex of the animals were recorded. A total of 139 dogs (77 male, 62 female dogs) feces collected and were kept at +4 °C in lid stools until examination. Dogs are divided into two groups, 0-1 years old and over 1-year-old. (Table 1)

Stool specimens were first examined macroscopically in the laboratory of the Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University and then microscopically examined with respect to helminth eggs with a saturated saline flotation technique (Maff 1986).

In the study, the chi-square test was used for statistical analysis of infection status in animals according to age groups and sex. A value of $P < 0.05$ was considered significant. Statistical Package for the Social Sciences for Windows 16.0 (SPSS Inc .; Chicago, IL, USA) package program was used for the analysis of the data.

RESULTS

139 dogs were examined in this study, and 48 dogs (34.5%) were infected with at least one helminth species. Helminth eggs were found in 23 (37.1%) of 62 examined female dogs and 25 (32.5%) of 77 male dogs. Adult and development forms of heminths were not seen during macroscopic examination. When evaluated according to age groups; helminth infections were detected in 10 dogs (40%) of 25 dogs in the first group and 38 (n:114) of the dogs in the second age group. 139 dogs were examined and infection rates of helminth species were given in Table 2.

The statistically significant difference between males and females with regard to the appearance of helminth infections was found to be insignificant by the chi-square test. In female dogs, 1.2 times more helminth infection was detected (Table 2). Although the rate of infection in dogs over the age of 1 was 1.2 times lower than in dogs between 0 and 1 years, there was no statistically significant difference between the chi-square test in these two age groups (Table 3).

Table 1. Distribution of dogs examined by gender and age groups

Gender	Age Groups	
	0-1 years old (First group)	Over 1-year old (Second group)
Male (n:77)	11	66
Female (n:62)	14	48
Total (139 Dog feces)	25	114

Table 2. Distribution of infecting species by gender and age groups.

Helminth species	Female (n:62)		Male (n:77)		First age group(n:25)		Second age group (n:114)		Total number (n:139)	
	%		%		%		%		%	
<i>Toxocaracanis</i>	13	21	13	6.9	6	24	20	17.5	26	18.7
<i>Toxascarisleonina</i>	5	8.1	3	3.9	1	4	7	6.1	8	5.5
<i>Taeniaspp.</i>	2	3.2	4	5.2	1	4	5	4.4	6	4.3
<i>Ancylostomaspp.</i>	1	1.6	4	5.2	1	4	4	3.5	5	3.3
<i>Uncinariaspp.</i>	4	6.5	5	6.5	2	8	7	6.1	9	6.5
<i>Ancylostomaspp.</i> + <i>Uncinariaspp.</i>	0	0	1	1.3	0	0	1	0.9	1	0.7
<i>T. canis</i> + <i>T. Leonina</i>	2	3.2	2	2.6	0	0	4	3.5	4	2.9
<i>Ancylostomaspp.</i> + <i>T. Canis</i>	0	0	1	1.3	1	4	0	0	1	0.7

Table 3. Associated with the prevalence of helminth infections in dogs in Isparta province statistical analysis of risk factors

Parameters	Categories	χ^2	Probability Ratio	Confidence interval		P Value
				Lower limit	Upper limit	
Gender	Female	0.32	1.22	0.60	2.47	0.568
	Male		0.9	0.72	1.19	
Age groups	0-1	0.40	1.33	0.54	3.24	0.526
	1↑		1.07	0.90	1.27	

DISCUSSION and CONCLUSION

In Turkey, dogs live in homes and gardens, free in villages (especially shepherd dogs), homeless in the streets, and also in shelters. People train dogs for hunting, guard, herd management, search-rescue, ornamentation and guidance (Atasoy and Kanlı 2005).

In different studies based on fecal and autopsy findings in order to determine the prevalence of gastrointestinal helminth infections in dogs around the world; 50% in Hungary (Fok et al. 2001), 72.8% in Japan (Asano et al. 2004) and 26% in Greece (Papazahariadou et al. 2007).

According to studies conducted in different regions of Turkey; In Ankara, 80%, in Van, 41% in Aydın, 73.8% in Kars, 46% in Afyon, 37.7% in Konya, 33.6% in Eskişehir, 28.4% in Samsun, , 19.4% in

Sivas, 100% and 32.7% in Diyarbakır. (Saygı et al. 1990, Çerçi 1992, Güçlü and Aydenizöz 1995, Umur and Arslan 1998, Orhun and Ayaz 2006, Kozan et al. 2007, Ünlü and Eren 2007, Yıldırım et al. 2007, Gürler et al. 2015, Sayın- Silk and Koçhan 2017). In this study, 34.5% of the dogs reported helminth infection was diagnosed and this finding was found to be lower than the rates reported in Ankara, Van, Aydın, Kars, Afyon, Sivas and higher than the rates reported in Diyarbakır, Eskişehir, Konya and Kayseri, Samsun. These differences may be due to differences in animal numbers, drug use, and regional differences in socioeconomic conditions.

In a study conducted in Nigeria, 56.6% of male dogs and 54.6% of females had gastrointestinal helminth infection (Idike et al. 2017). In another study, 57.8% of male dogs and 58.3% of females detected general helminth infection (Naz 2014). In

our study, the infection rate was determined in close proximity in male and female according to the above findings.

In the study conducted by Sowemimo and Ayanniyi (2017), 39.5% of the dogs in the 0-6 age group and Giselasie et al. (2013) in the other researches reported helminth infections in 93.8% in young dogs and 80.9% in adults. In this study, the infection rates detected in adult and young dogs are compatible with the above studies.

Toxocara is a canine parasite. People take the parasite by accidentally.. The larval form of *T. canis* is found in the tissues of all dogs, in many birds and other mammals. Dog or canid host is a definite host and only in definite hosts, *T. canis* can develop from the larval form to adult form. When *T. canis* is in a host, the name of the disease is called Toxocariasis. Many animals, such as mice, rabbits, and monkeys, can serve as parasites host. It is very important for the health of the people and causes the internal organ larva migrans in humans. In studies on the prevalence of *T. canis* in dogs, 28% (Öncel 2004) in Istanbul, 31.4% (Nas 2014) in Siirt, 9.38% (Öge et al. 2017) in Ankara, 36.2% in Afyon, 47.8% (Kozan et al. 2007) in Eskişehir and 20.3% (Balkaya and Avcioğlu 2011) in Erzurum were reported. The rate of 18.7% obtained in this study was found to be low in the above-mentioned ratio but it was found higher than that of Öge et al. (2017) in Ankara. As a result, it was evaluated that the majority of the animals in the stool were due to age resistance against parasite due to the presence of older animals (Oge et al. 2017).

Studies in Turkey, *T. leonina* rate 1 – 60.9 % (Ünlü and Eren 2007, Kozan et al. 2007), the proportion of hook worms 1.1-59.4% (Yıldırım et al. 2007, Kozan et al. 2007), *Uncinaria* spp. the ratio was reported 2.8 -57.1% (Naz 2014, Umur and Arslan 1998). In this study, *T. leonina* 5.5%, *Ancylostoma* spp. 3.3% and *Uncinaria* spp. 6.5% was detected. It is thought that these different proportions of the spread can be derived from the methods used and ecological differences.

Cystic echinococcosis (CE) is an important zoonosis caused by *Echinococcus granulosus* in the Taeniidae family, which causes significant problems in both human and animal health in endemic areas. In the spread of hydatid cyst, which adversely affects the country's economy and public health, dogs play an important role as the final host. This disease causes people to lose their economic, social and labor parameters. On the other hand, expenses for diagnosis of the disease, operating costs, hospitalization, maintenance and medical costs, transportation costs in terms of serious economic

costs and labor and productivity losses, while reducing the life-long productivity of many vital activities such as reducing (Thompson et al. 1995). In dogs, *Taenia* spp. , 28% in Muş (Acıöz 2008), 12.5% in Ankara (Öge et al. 2017), 3.8% in Diyarbakır (Sayın-İpek and Koçhan 2017), 23.9% in Eskişehir (Kozan et al. 2007) and 40% in Kars (Umur and Arslan 1998) respectively. *Echinococcus granulosus* eggs look like other *Taenia* spp eggs. It is not possible to distinguish microscopically from eggs. This distinction can only be demonstrated by studies carried out at the serological and molecular level. Öge et al. (2017) reported that the results of a microscopic study of dog feces in the study conducted by *Taenia* spp. found that 51.8% of the eggs they identified belonged to *E. granulosus* by copro-PCR and that this situation threatened public health. For this reason, *Taenia* spp. when considering that eggs may also be *E. granulosus* eggs, it is an indispensable element in informing animal owners or breeders about conservation and control programs.

As a result; dogs in the Isparta province need to be treated with appropriate anthelmintics to struggle against these diseases, as the presence of helminths in the zoonotic character can create risk potential for human and animal health and may also cause economic loss. It is also very important for local veterinarians and the public to make awareness of the protection and control programs.

REFERENCES

- Acıöz M.** Muş Yöresinde Köpeklerde PCR Yöntemiyle, Kesim Hayvanlarında Kesim Takipleriyle ve İnsanlarda Elisa Yöntemiyle Echinococcosis Sıklığının Araştırılması. Doktora tezi, CumhuriyetÜniv Sağlık Bil Enst, Sivas, 2008.
- Asono K, Suzuki K, Matsumota T, Sakai T, Asano R.** Prevalence of dogs with intestinal parasites in Tochigi, Japan in, 1979, 1991 and 2002. *VetParasitol.* 2004; 120: 243-248.
- Atasoy F, Kanlı O.** Türk Çoban Köpeği Kangal. Medisan Yayınevi, Ankara.2005.
- Balkaya İ, Avcioğlu H.** Gastro-intestinal helminths detected by coprological examination in stray dogs in the Erzurum province Turkey. *Kafkas UnivVet FakDerg.* 2011; 17(Suppl.A), 43-46.
- Çerçi H.** Ankara ili Elmadağ ilçesi kırsal yöre köpeklerinde görülen mide-bağırsak helmintlerinin yayılışı ve insan sağlığı yönünden önemi. *T ParazitDerg.* 1992;16: 59-67

- Fok E, Szatmari V, Busak K, Rozgonyi F.** Prevalence of intestinal parasites in dogs in some urban and rural areas of Hungary. *Vet Q.* 2001; 23: 96-98.
- Fuentes R, Cardenas J, Aluja A.** Calculo de la poblacion canina en la Ciudad de Mexico, determinacion de sus condiciones de atencion y su destino. *Vet. Mex.*, 12 (1981), pp. 59-71.
- Giselasie D, Geyola M, Dagne E, Asmare K, Mekuria S.** Gastrointestinal Helminthes in dogs and Community Perception on Parasite Zoonosis at Hawassa City, Ethiopia. *Global Veterinaria.* 2013; 11(4): 432-440.
- Güçlü F, Aydenizöz M.** Konya'da köpeklerde dışkı bakılarına göre parazitlerin yayılışı. *T Parazitol Derg.* 1995; 19: 550-556.
- R.C.A. Thompson, A.J. Lymbery (Eds.)** Echinococcus and Hydatid Disease, CAB International, Wallingford, UK 1995, pp. 233-331
- Gürler AT, Bölükbaş CS, Pekmezci GZ, Umur Ş, Açıcı M.** Nematode and cestod eggs scattered with cats-dogs feces and significance of public health in Samsun, Turkey. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 2015; 62; 23-26.
- Idika IK, Onuorah EC, Obi CF, Umeakuana PU, Nwosu CO, Onah DN, Chiejina SN.** Prevalence of gastrointestinal helminth infections of the dog in Enugu State, South Eastern Nigeria. *Parasite Epidemiol and Control.* 2017; 2: 97-104.
- Işık N, Ekici ÖD, Köse Sİ.** Konya yöresi sokak köpeklerinde dışkı bakısına göre saptanan gastrointestinal helmintler. *Eurasian J Vet Sci.* 2014; 30(3). 162- 165.
- Kozan E, Kırçalı Sevimli F, Birdane FM.** Afyonkarahisar ve Eskişehir İllerindeki Sokak Köpeklerinde Görülen Gastrointestinal Cestod ve Nematod Enfeksiyonları. *T Parazitol Derg.* 2007; 31(3): 208- 211.
- Macpherson CNL, Meslin FX, Wadeler AI.** Dogs, Zoonoses and Public Health. CABI Publishing, New York. 2012.
- MAFF (Ed.).** Manual of Veterinary Parasitological Techniques. Her Majesty's Stationary Office, London. 1986. 160 pp.
- Naz İ.** Siirt Yöresinde Dışkı Muayenesine Göre Köpeklerde Bulunan Sindirim Sistemi Helmintleri. Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van, 2014.
- Orhun R, Ayaz E.** Van yöresi köpeklerinde bulunan endoparazitler ve halk sağlığı yönünden önemi. *T Parazitol Derg.* 2006; 30: 103-107.
- Öge H, Öge S, Özbakış G, Gürcan İS.** Çoban Köpeklerinde Dışkı Bakısına Göre Helmint Enfeksiyonları Zoonoz Önem. *T Parazitol Derg.* 2017; 41: 22-7.
- Öncel T.** İstanbul'da evlerde beslenen köpeklerde Toxocariosis canis. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg.* 2004; 10: 151-153.
- Papazahariadou M, Founta A, Papadopoulos E, Chliounakis S, Antoniadou-Sotiriadou K, Theodorides Y.** Gastrointestinal parasites of shepherd and hunting dogs in the Serres prefecture, northern Greece. *Vet Parasitol.* 2007; 148: 170-3.
- Saygı G, Özçelik S, Temizkan N.** Sivas sokak köpeklerinin ince bağırsaklarında bulduğumuz helmintler. *T Parazitol Derg.* 1990; 14: 81-93.
- Sayın-İpek DN, Koçhan A.** Diyarbakır İlinde Sokak Köpeklerinde Görülen Mide Bağırsak Helmintleri, *Harran Üniv Vet Fak Derg.* 2017; 6(2): 133-137.
- Sowemino OA, Ayanniyi O.** Gastrointestinal Helminth Parasites of Domestic Dogs in Ilesa, Osun State, Nigeria: A Faecal Examination Survey Study. *Journal of Bacteriology and Parasitology.* 2017; 8(3): 2155-9597.
- Umur Ş, Arslan MÖ.** Kars yöresi sokak köpeklerinde görülen helmint türlerinin yayılışı. *T Parazitol Derg.* 1998; 22: 188-193.
- Ünlü H, Eren H.** Aydın yöresi sokak köpeklerinde dışkı bakısına göre saptanan mide bağırsak helmintleri. *T Parazitol Derg.* 2007; 31: 46-50.
- Yaman M, Ayaz E, Gül A, Muz MN.** Investigation of helminth infections of cats and dogs in the Hatay province. *Turkiye Parazitol Derg* 2006; 30: 200-4.
- Yıldırım A, Iça A, Düzlü Ö, Yavuz A, İnci A.** Kayseri yöresinde dışkı muayenesine göre köpeklerde bulunan sindirim sistemi helmintleri ve bunların yaygınlığı. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg.* 2007; 4(2): 65-71.

Afyonkarahisar'da Bir Keçide Sekonder Enfeksiyonlarla Birlikte Seyreden Koksidiyosis Olgusu

Ahmet GÖKSU¹, M.Fatih BOZKURT², Hatice ÇİÇEK¹, M.Sinan EREZ¹, D.Fatih BAŞER³

¹Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı

²Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

³Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı

*Corresponding author e-mail: hcicek@aku.edu.tr

ÖZ

Bu çalışmada, 3 aylık erkek kıl keçisi oğlakta sekonder enfeksiyonlarla birlikte seyreden coccidiosis olgusu sunuldu. Olgu materyalini, Nisan 2016 tarihinde Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi teşhis ve analiz laboratuvarına ölüm sonrası tanı amaçlı getirilen bir oğlak oluşturdu. Anamnezde ölüm öncesi iştahsızlık ve zayıflık görüldüğü bildirildi. Sistemik nekropsisi yapılan oğlakta şiddetli koksidiyal enteritis, kataral bronkopnomoni ve karaciğerde sentral nekroz ile tüm bağırsak bölümlerinin mukozalarında 2-5 mm çaplarında, yüzeyden taşkın, boz-beyaz veya parlak kırmızı renkte, sert kıvamlı çok sayıda nodüller görüldü. Bağırsakların histopatolojik incelemesinde *Eimeria* etkenlerine ait gelişim dönemleri saptandı. Bağırsaklardan alınan dışkı numunelerinin flotasyonla muayenesinde *Eimeria* spp. ookistlerine rastlandı. Tür tespiti amacıyla dışkı numunelerine %2,5 potasyum dikromat ilave edilip petri kutusu içerisinde bekletilerek oda ısısında sporlanma sağlandı. Sporlanan ookistlerin mikroskopik incelemesi sonucunda, oğlağın *E.christenseni* (*Eimeria absata*), *E.arloingi* (*E.ovina*), *E.ninakobhyakimovae* (*E.ovinoidalis*) ve *E.caprina* türleriyle enfekte olduğu saptandı. Sonuç olarak, coccidiosis oğlaklarda diğer hastalıklarla birlikte seyretmesi durumunda hastalık tablosunu ağırlaştırarak ani ölüme yol açabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: *Coccidiosis*, Keçi, Afyonkarahisar

Mortality Associated With Coccidiosis and Secondary Infections in A Goat in Afyonkarahisar

ABSTRACT

This study was carried out in order to present coccidiosis associated with secondary infections case in a naturally infected 3 months old hair goat. After dying it was brought to Veterinary Diagnosis and Analysis Laboratory, Afyon Kocatepe University in order to make diagnosis in April, 2016. Anorexia and weakness was reported during anamnesis. During systemic necropsy catarrhal bronchopneumonia, central necrosis in liver and severe coccidial enteritis, large number of nodules which has 2-5 mm diameter, grizzly white or garish red, stiff consistency has been seen through all intestine parts. *Eimeria* development forms was detected during histopathologic examination of intestines. *Eimeria* spp. oocyst was determined in the faeces sample which is taken from intestines with the using flotation technique. 2.5 % potassium dichromate was added in order to identify species and sporulation was provided in petri dishes at the room temperature. At the end of microscopic examination of sporulated oocysts, *E.christenseni* (*Eimeria absata*), *E.arloingi* (*E.ovina*), *E.ninakobhyakimovae* (*E.ovinoidalis*) and *E.caprina* was determined. As a result, coccidiosis in young goats can cause suddenly death associated with secondary infections.

Keywords: *Coccidiosis*, Goat, Afyonkarahisar

GİRİŞ

Eimeria soyuna bağlı apicomplexan protozoonların neden olduğu coccidiosis, bütün dünyada keçilerde sıkça rastlanan paraziter hastalıklardan biridir (Dinçer ve Vatansever 2001; Silva et al. 2014; Yukarı 2016). Hastalık enfekte oğlaklarda yüksek oranda ölüme yol açması ve ağırlık kazancında azalmaya sebep olması nedeniyle ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Lima, 2004). Keçi coccidiosisi yetiştiricilik yöntemine bağlı olarak 4-10 haftalık oğlakların % 100'ünü etkileyebilmekte, keçi üretiminde önemli kayıpların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (Ruiz ve ark., 2010). Kalabalık ağllar, sütten kesme, yem değişiklikleri, nakil, soğuk yada sıcak havalarda hastalığın diğer yaş gruplarında da ortaya çıkmasına ve sorun oluşturmaya neden olmaktadır (Gül, 2007). Hastalık, oğlaklarda özellikle sütten kesme döneminde, şiddetli kanlı ishal ile birlikte kilo kaybı, sıvı kaybı ve büyümede gecikmeye yol açmaktadır (Koudela ve Bokova, 1998). Keçilerde 17 *Eimeria* türünün bulunduğu bildirilmiş, bunlardan *Eimeria christenseni*, *E.arloingi*, *E.caprina* ve *E.ninakobhyakimovae* türleri oldukça patojen türler olarak açıklanmıştır (Kheirandish ve ark., 2014).

MATERYAL ve METOT

Olgu Sunumu

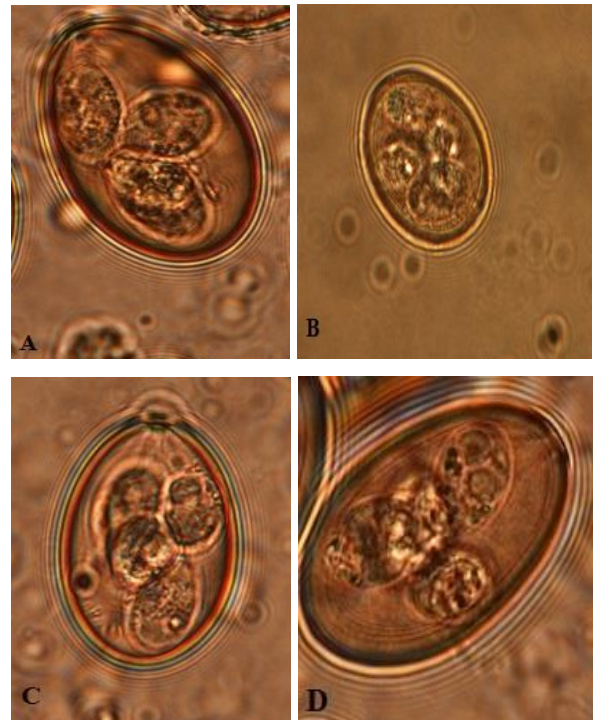
Ölüm öncesi iştahsızlık ve zayıflık görülen 3 aylık erkek kıl keçisi oğlak, Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi teşhis ve analiz laboratuvarına ölüm sonrası tanı amaçlı getirilmiştir. Alınan anamnezde, bir ay içinde aynı sürüdeki 2-4 aylık 60 adet oğlağın da benzer bulguları takiben öldüğü bildirilmiştir. Sistemik nekropsisi yapılan oğlaktaki şiddetli koksidiyal enteritis, kataral bronkopnomoni ve karaciğerde sentral nekroz ile tüm bağırsak bölümlerinin mukozalarında 2-5 mm çaplarında, yüzeyden taşkın, boz-beyaz veya parlak kırmızı renkte, sert kıvamlı çok sayıda nodüller tespit edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Duodenum lümeninde şiddetli ve difüz nodüler hiperplazi

Figure 1. Diffuse nodular hyperplasia in lumen of duodenum

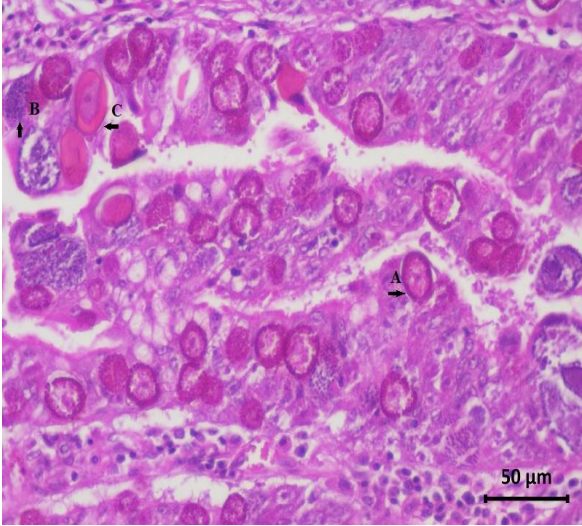
Bağırsak bölümlerinden toplanan dışkı numuneleri Fulleborn'un doymuş tuzlu su metodu ile incelenmiştir. Dışkı örneklerinden bir miktar alınarak çeşme suyu ile karıştırılmış, iyice ezilmiş ve süzgeçten geçirildikten sonra ayrı ayrı petri kutularına aktarılmıştır. Petri kutularının üzerine % 2,5 Potasyum dikromat ilave edildikten sonra laboratuvarında sporlanmaya bırakılmıştır. Sporlanmış ookistlerin ölçümü, santrifüj flotasyon tekniği kullanılarak Nikon Eclipse i-Series 80i trinokular araştırma mikroskopunun x100'lük büyütmesinde DS-5M-L1 dijital kamera sistemi ile mikrometrik olarak yapılmıştır. Tür tespiti amacıyla dışkı süspansiyonu 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılıp 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atıldıktan sonra geriye kalan çökelti üzerine bir miktar flotasyon sıvısı aktararak tüp uygun bir kapakla kapatılıp çökelti iyice karışana kadar çalkalanmış, tüp ağzına kadar flotasyon sıvısı ile tamamlanmıştır. Tüp üzerine lamel kapatılıp 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra lamel alınıp lam üzerine konduktan sonra *Eimeria* ookistlerinin tür ayrımları, ilgili literatürlerden yararlanılarak yapılmıştır (Coudert, 1992; Dinçer ve Vatansever 2001; Yukarı, 2016). Sporlanan ookistlerin mikroskopik incelemesi sonucunda, oğlağın *E.christenseni*, *E.ninakobhyakimovae*, *E.arloingi* ve *E.caprina* türleriyle enfekte olduğu görülmüştür (Şekil 2).



Şekil 2. A. *E.christenseni*, B. *E.ninakobhyakimovae*, C. *E.arloingi*, D. *E.caprina*

Figure 2. A. *E.christenseni*, B. *E.ninakobhyakimovae*, C. *E.arloingi*, D. *E.caprina*

Oğlaktan sistematik olarak alınan doku örnekleri %10'luk tamponlu formaldehitte tespit edildikten sonra rutin patoloji doku takibine alınmış ve parafinde bloklanmıştır. Hazırlanan bloklardan 5 mikron kalınlığında seri kesitler alınarak hematoksilin-eosin (H&E) ile tekniğine uygun olarak boyanmıştır. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus CX41) ve yüksek çözünürlüklü kamera altında (Kameram®) X20 ve X40 objektifler ile incelenmiştir. Bağırsakların histopatolojik incelemesinde duodenum, ileum ve jejunumda *Eimeria* etkenlerine ait gelişim dönemleri saptanmıştır (Şekil 3).



Şekil 3. A. Makrogamet B.Mikrogamet C. Ookist
Figure 3. A. Makrogamet B.Mikrogamet C. Ookist

TARTIŞMA ve SONUÇ

Coccidiosis Türkiye'de oğlak ve kuzularda yaygın olarak görülen, sürü sağlığını tehdit ederek büyük ölçüde kayıplara neden olan önemli paraziter hastalıklardan biridir (Yukarı, 2016). Keçilerde bulunan türler arasında *Eimeria ninakobhyakimovae*, *E.caprina*, *E.arloingi*, *E.christenseni* ve *E.birci* türlerinin oldukça patojen oldukları bildirilmiştir (Taylor ve ark., 2007). Bu olguda oğlağın *E.ninakobhyakimovae*, *E.caprina*, *E.arloingi* ve *E.christenseni* türleriyle enfekte olduğu tespit edilmiştir. Klinik coccidiosisın ortaya çıkmasında etkenin patojenitesi, alınan ookist sayısı, alınma süresi, şizogoni sayısı, etkenin yerleştiği organ, hayvanın yaşı, ırkı ve bağışıklık durumunun oldukça önemli olduğu açıklanmıştır (Dik, 2001). Doğum sonrası ilk birkaç haftalık dönemde kolostromun coccidiosis'e karşı pasif bağışıklık sağladığı, daha sonraki 1-2 aylık dönemde hastalığa karşı duyarlılığın fazlaştığı gözlemlenmiş, eş zamanlı olarak seyreden diğer enfeksiyonların da katkısı ile hastalığın şiddetinin daha da arttığı bildirilmiştir (Taylor ve ark., 2007). Bu çalışmada ölüm öncesi iştahsızlık ve zayıflık görülen 3 aylık oğlağın sistemik nekropsisinde şiddetli koksidiyal enteritis,

kataral bronkopnomoni ve karaciğerde sentral nekroz saptanmıştır. Coccidiosis'te akut vakalarda dışkı sulu ve bazen kanlıken, subklinik ve kronik coccidiosis'te dışkının kıvamında bir değişiklik görülmemektedir (Soulsby, 1986). Klinik coccidiosis görülen hayvanlarda, bağırsaklarda oluşan doku tahribatı, kanama ve ishal, sekonder enfeksiyonların ortaya çıkışını da kolaylaştırmaktadır (Dik, 2001). Aşırı miktardaki intestinal kanamalar, bazen ani ölümlere yol açabilmektedir (Marsh, 1965). Bu olguda patojen türler ile enfekte oğlakta, bağırsakların belirgin derecede kanamalı olduğu dikkati çekmiş, akut dönemde klinik belirtiler ortaya çıkmadan ani ölüm şekillenmiştir. Oğlak ve kuzulardaki diğer enfeksiyöz ajanların, beslenme bozukluğu, stres ve çevre koşulları yetersizliğinin coccidiosis'in patojenitesini artırdığı, özellikle intensif yetiştiriciliğin yapıldığı işletmelerde insidens artışının gözlemlendiği bildirilmiştir (Dinçer ve Vatansever, 2001). Bu olgu ile oğlaklarda ani ölümlerin görülmesi durumunda coccidiosis'in de göz önünde bulundurulması gerektiği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Coudert P.** *Eimeria* species from the goat. IV Conference COST-89, Tours, INRA, October 1992.
- Dik B.** Coccidiosis'de klinik belirtiler. In: Coccidiosis. Edit: Dinçer Ş. Türkiye Parazitol. Dern. Yay. No: 17, İzmir. 2001.
- Dinçer Ş, Vatansever Z.** Koyun ve Keçilerde Coccidiosis. In: Coccidiosis. Edit: Dinçer Ş. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 17. 2001.
- Gül A.** The prevalence of *Eimeria* species in goats in Iğdır. Turk J Vet Anim Sci. 2007; 31 (6): 411-414.
- Koudela B, Bokova A.** Coccidiosis in goats in the Czech Republic. Vet Parasitol. 1998; 76 (4): 261-267.
- Kheirandish R., Nourollahi-Fard SR., Yadegari Z.** Prevalence and pathology of coccidiosis in goats in southeastern Iran. J Parasit Dis. 2014; 38 (1): 27-31.
- Lima JD.** Coccidiose dos ruminantes domesticos. Rev Bras Parasitol Vet. 2004; 13 (S1): 9-13.
- Marsh H.** Newsom's sheep Diseases. 3rd Edition Waverly Press, Baltimore, USA.1965.
- Ruiz A, Behrendt JH, Zahner H, Hermosilla C, Perez D, Matos L.** Development of *Eimeria ninakobhyakimovae* in vitro in primary and permanent cell lines. Vet Parasitol. 2010; 173 (1-2): 2-10.

- Silva LMR., Vila-Viçosa MJM., Nunes T., Taubert A., Hermosilla C., Cortes HCE.** *Eimeria* infections in goats in Southern Portugal. Braz. J. Vet. Parasitol., Jaboticabal. 2014; 23(2): 280-286.
- Soulsby EJL.** Helminths, Arthropods and protozoa of Domesticated Animals. 7th. edition, London. 1986.
- Taylor MA, Coop RL, Wall RL.** Veterinary Parasitology. Blackwell Publishing, 3rd Edition, UK. 175-191.2007.
- Yukarı B.** Coccidiosis. In: Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıkları. Edit: Özcel MA. Meta Basım, Bornova, İzmir. 2016.

Instruction for Authors

Kocatepe Veterinary Journal (KVJ) has the policy with One Medicine One Health. Research article, reviews, brief communication and case reports, letters to editor and book reviews are also welcome for consideration to publish articles of high scientific and ethical standards.

The journal is published four times a year. The publication of the text and figures is **free** of charge.

Acceptance of papers for the KVJ is undertaken by Editors. Editorial Board members adjudicate in the case of conflicting or adverse reports.

Manuscripts are accepted for consideration on the understanding that they are for publication solely in KVJ and that they neither have been published nor are under consideration for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher.

Each author accepts all ethical responsibility of the article and all authors agree with the content of the study. After article is checked by **Professional Plagiarism Prevention** program, article will be sent to authors.

Articles are checked by iThenticate® program, when plagiarism or self-plagiarism are detected, they will not be evaluated for publication.

If animals are used in the studies, study should be approved by an Ethical Committee, Name of Ethical Committee and Approved Number should be mentioned in the Material and Method section. Editor may reject directly the article, if animal is exposed to stressful or painful conditions.

Authors accept ethical rules when article is sent for publication. Author(s) should send Copyright Transfer Agreement, after acceptance of article.

Each author accepts all ethical responsibility of the article and all authors agree with the content of the study.

Article should be written using Garamond, font of 11 point, with 1.5 line spacing, margins of the A4 paper should be 2.5 cm from all edges (Word97-2010.doc). Abbreviations should be written in SI. Research article submitted to Kocatepe Veterinary Journal should be divided into the following sections:

Title page (Abstract, Key words without authors name and address), **Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, References, Tables, Graphics, Figures.**

Title page: Papers should be headed with the full title, the initial letters of name and surnames of the authors, the name and address of the institution where the work is carried out. The telephone number, fax number and e-mail address of the corresponding author should also be provided. The title should be short, specific and informative.

Abstract Should be no more than 200 words, outlining in a single paragraph.

Keywords, 5 keywords that describe the crucial points of the paper should be provided. Keywords should be chosen from Turkey Science Term (www.bilimterimleri.com)

Introduction, an updated literature related to paper and aim(s) of the study should be clearly given in this section.

Materials and methods, a clear account of materials used and methods employed should be given and it should be applicable/repeatable by other researchers.

Results, as concise as possible. Text, tables and figures illustrating the same data should be limited and succinctly outline the pertinent outcomes of the study.

Discussion: Results of the study should be discussed with directly relevant references. This section may also be divided into subsections.

Conclusions: This section should state clearly the main conclusions of the research. Results should not be repeated.

Acknowledgements, it is advised to acknowledge persons or institutions directly or indirectly involved in the study.

References

References in the text should be made as follows: **Kara (2012)** described. / . was reported (**Zemheri 2015, Eryavuz and Yeni, Eryavuz et al. 2015**). List of references should be given alphabetically in the reference list. Different publications having the same author(s) of same year should be written as **2011a, 2011b**. Web address should be referenced as **anonim** for example **Anonim 2015**. Only official web pages should be used. Author name(s) and date should be written bold. The reference list at the end of the paper should be written as below.

Journal:

Ince S, Kucukkurt I, Cigerci IH, Fidan AF, Eryavuz A. The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats. *J Trace Elem Med Biol.* 2010; 24(3):161-164.

Book section:

Juneja R, Koide SS. Molecular Biology of Reproduction, In: *Reproduction in Farm Animals*, Ed; HafezB, Hafez ESE, 7th Ed., LippincottWilliams and Wilkins, Philadelphia, USA. 2000; pp. 354-361.

Web page:

Anonymous. http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?tb_id=46&cust_id=13;Accessien date: 02.01.2012.

Thesis:

Yeni D. Some andrological parameters and biochemical properties in relation to season in rams. PhD thesis, Afyon Kocatepe University Health Science Institute, Afyonkarahisar, 2010.

Tables: Tables should be presented in a separate page at the end of manuscript.

Graphics: Figures should be presented in a separate page at the end of manuscript.

Figures : Figures should be presented in a separate page at the end of manuscript. Figures should be 80 or 160 mm, minimum 300 dpi.

Titles of tables, graphics and figures should be both Turkish and English.

Brief Communications: Brief communications should be concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later publication. They should not exceed 1600 words. They should bear no more than two tables or figures. An ABSTRACT should be given but no other sections. Typescripts should be clearly marked Brief Communication.

Review Articles: Review articles related to all medical topics are welcome for publication. They should give an update on recent advances in a particular field and be targeted at research veterinarians or clinicians who are not necessarily working in the same field. The length should not exceed 4500 words. It should have a precise abstract. Author of review should have at least two citations. For each issue maximum 2 reviews are published.

Case Reports: Reports of SINGLE or small numbers of cases will be considered for publication in KVJ if the case(s) are particularly unusual/rare or the report contributes materially to the literature. A case report should not exceed 1500 words and must comprise a Summary (maximum 150 words), Introduction, Case History and Discussion. The report should accomplish one of the followings:

- To be a substantially novel presentation
- To be a technique or treatment that would substantially alter management and prognosis of the described condition
- The first clinical report or first case(s) of diseases in a particular location where epidemiology is an important factor
- To exemplify best practice in medical science.

Letters to The Editor: Letters describing case reports or original material may be published in the KVJ and will be peer-reviewed prior to publication. Letters making criticisms on recently published papers in the KVJ will also be considered and the corresponding authors of the original paper will be invited to respond accordingly.

All articles sent to KVJ (Kocatepe Veterinary Journal) ONLINE submission only.

During submission documents which are listed below, have to install to the system;

1. **Title Page:** Author and institution names
2. **Main text:** Author and institution names should NOT be. Tables(s), graphic(s) and figure(s) etc. Should be on the last page of article, also title of them both in Turkish and English.
3. **Article addition:** Table(s), graphic(s) and figure(s) should have been installed to the system separately.
4. **Author Approval Form (Cover Letter):** All authors need to sign it and install to the system. Signatures should be wet signatures and send to the Editorial Board of Kocatepe Veterinary Journal.
5. **Copyright:** All authors need to sign it and install to the system. Signatures should be wet signatures and send to the Editorial Board of Kocatepe Veterinary Journal.