



Official Publication of
The Afyon Kocatepe University
Faculty of Veterinary Medicine

K o c a t e p e Veterinary Journal

2018, 11 (4), December



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
Assoc. 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 Alışarlı	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	
Osteometric Examination of Skeletal Remains of Sheep Uncovered in Excavations Performed in Ancient City of Kibyra (<i>Kıbyra Antik Kenti Kazılarında Ortaya Çıkarılan Koyun İskeleti Kalıntılarının Osteometrik Olarak İncelenmesi</i>) Yasin DEMİRASLAN, İftar GÜRBÜZ, Ömer Gürkan DİLEK, Şükrü ÖZÜDOĞRU, Özcan ÖZGEL	344-355
Pırlak Koyunlarında BMP1B, BMP15 ve GDF9 Genlerinde Olası Polimorfizmlerin Araştırılması (<i>Investigation of Possible Polymorphisms in BMP1B, BMP15 and GDF9 Genes in Pırlak Sheep</i>) Koray ÇELİKELOĞLU, Metin ERDOĞAN, Özlem HACAN, Serdar KOÇAK, Zehra BOZKURT, Mustafa TEKERLİ	356-362
Üniversite Kampüs Kantinlerindeki Gıdaların Mikrobiyolojik Kalitesinin ve Gıda Çalışanlarının El Hijyen Durumlarının Değerlendirilmesi (<i>Evaluation of Hand Hygiene Situation of Food Handlers and Microbiological Quality of Retailed Some Foods in University Campus Canteen</i>) Şebnem PAMUK, Metin ERDOĞAN, Yeliz YILDIRIM, Harun HIZLISOY, Serhat AL, Özgür SEPİN	363-373
17β-Östradiolün Overiektomize Ratlarda Spontan Myometriyal Kasılmalar Üzerine Etkisi (<i>Effects of 17β-Estradiol on Spontaneous Myometrial Contractions in Overiectomized Rats</i>) Özlem YILDIZ GÜLAY, Aziz BÜLBÜL	374-384
Studies on Tick (<i>Ixodoidea</i>) Infestation in Sheep, Goats and Cattle in Afyonkarahisar Region (<i>Afyonkarahisar Yöresindeki Koyun, Keçi ve Sığırlarda Kene (Ixodoidea) İnfestasyonu Üzerine Araştırmalar</i>) Mustafa ESER, Hatice ÇİÇEK	385-393
Broiler Tavuklarda Mersin, Biberiye ve Kekik Esansiyel Yağlarının Bağırsak Motilitesi Üzerine Etkisi (<i>The Effect of Essential Oils of Myrtle, Rosemary, and Thyme on Intestinal Motility in Broiler</i>) Tuba BÜLBÜL, Vural ÖZDEMİR, Elmas ULUTAŞ, Aziz BÜLBÜL	394-401
Effects of Lonidamine-Loaded Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles on Cardiac Fibrosis Induced By High-Dose Testosterone Propionate In Adult and Neutered Male Rats (<i>Yetişkin ve Kastre Edilmiş Erkek Ratlarda Yüksek Doz Testosteron Propiyonatın İndüklediği Kardiyak Fibrozis Üzerine Lonidamin Yüklü Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Etkisi</i>) Mehmet Eray ALCIGIR, Ceyda Tuba SENGELE TÜRK, Canan HASÇİÇEK, Okan EKİM	402-413
Afyonkarahisar İlinde Satışa Sunulan Tavuk Eti ve Sakatatlarında <i>Salmonella</i> spp. Varlığının Belirlenmesi (<i>Presence of Salmonella spp. in Chicken Meat and Giblets Marketed in Afyonkarahisar Province</i>) Ulaş ACARÖZ, Zeki GÜRLER, Recep KARA, Damla ARSLAN-ACARÖZ, Fahriye ZEMHERİ	414-418
Postpartum Nonsiklik Sütçü İneklerde Progesteron-Östradiol, Progesteron-GnRH-Prostaglandin F_{2α} veya Östradiol ile Tedaviden Sonra Folliküler Değişiklikler ve Reprodüktif Performans (<i>Follicular Changes and Reproductive Performance in Postpartum Noncyclic Dairy Cows After Treatment with Progesterone and Estradiol or with Progesterone, GnRH, Prostaglandin F_{2α} and Estradiol</i>) Hasan Basri TEK, Yavuz NAK, Ahmet GÜMEN, Kamil SEYREK-İNTAŞ, Abdülkadir KESKİN	419-429
Molecular Characterization of <i>Demodex Canis</i> (Acarina: Demodicidae) in Domestic Dogs (<i>Canis Familiaris</i>) (<i>Evcil Köpeklerde (Canis Familiaris) Demodex Canis'in (Acarina: Demodicidae) Moleküler Karakterizasyonu</i>) Gökmen Zafer PEKMEZCİ, Didem PEKMEZCİ, Cenk Soner BOLUKBAS	430-433
The Use of L-Carnitine and Oregano As Feed Additives in Alternative Forced Molting Programmes in Laying Hens (<i>Yumurtaçı Tavuklarda Kekik (Oregano) ve L-karnitin'in Yem Katkısı Olarak Alternatif Zorlamalı Tüyl Dökümü Programında Kullanılması</i>) A. Burhaneddin AKKAYA, İsmail BAYRAM	434-446
Afyon Manda Kaymağı ve Kaymakaltı Sütlerinde Bazı Ağır Metallerin ICP-MS ile Araştırılması (<i>Investigation of Some Heavy Metals with ICP – MS in Afyon Buffalo Kaymak and Skimmed Milk</i>) Fahriye KAN, İsmail KÜÇÜKKURT	447-453
Expression Profile of Intraovarian Genes in Ovary Tissues at Follicular and Luteal Phases in Holstein Cattle (<i>Holştayn Sığırlarında Foliküler ve Luteal Fazdaki Ovaryum Dokularında İntraovarian Genlerin Ekspresyon Profili</i>) Selçuk ÖZDEMİR, Selim ÇOMAKLI, Harun ARSLAN	454-462
Use of Vitamin C for Premedication Prior to Medetomidine–Ketamine Anesthesia in New Zealand White Rabbits (<i>Yeni Zelanda Beyaz Tarşanlarında Medetomidin – Ketamin Anestezisi Öncesi Preanestezik Olarak Vitamin C Kullanılması</i>) Rahime YAYGINGÜL, Zeynep BOZKAN, Osman BULUT, Ali BELGE	463-467
Manda Sütlerinde ICP-MS ile Metal ve Ağır Metal Seviyelerinin Belirlenmesi (<i>Determination of Metal and Heavy Metal Residues in Buffalo Milk By ICP-MS</i>) Recep KARA, Ulaş ACARÖZ, Zeki GÜRLER, Sinan İNCE, Damla ARSLAN-ACARÖZ	468-471
Farklı Esansiyel Yağların Vakum Paketlenmiş Ve Soğukta Depolanmış Karidesler Üzerinde Duyusal Ve Kimyasal Etkileri (<i>The Chemical And Sensory Effects Of Different Essential Oils On Vacuum Packaged And Cold Stored Shrimps</i>) Suleyman ÖNER, Yasemin BİRCAN YILDIRIM	472-478
Sıçanlarda Akrilamid ile İndüklenen Oksidatif Strese Karşı Taurinin Koruyucu Etkisi (<i>Protective Effect of Taurine Against Acrylamide-Induced Oxidative Stress in Rats</i>) Sinan İNCE, Ulaş ACARÖZ, Damla ARSLAN-ACARÖZ, Nuray VAROL, Zeki GÜRLER, İsmail KÜÇÜKKURT, Hasan Hüseyin DEMİREL, Abdullah ERYAVUZ	479-490
REVIEW	
Antioxidant Safety and Antioxidant-induced Stress (<i>Antioksidan Güvenliği ve Antioksidan Kaynaklı Stres</i>) Recep ASLAN	491-496
LETTER TO EDITOR	
Köpek Epidermisinin pH Seviyesi: Gelişigüzel İnsan Ürünleri Pet Hayvanlarda Kullanılabilir mi? (<i>pH Level of Dog Epidermis: Could Human Products Be Used Randomly in Pet Animals?</i>) Kerem URAL, Hasan ERDOĞAN, Deniz Sude ATEŞ	497-500
CASE REPORTS	
Hepatic Fibrosis in Four German Shepherd Dogs Idiopathic, Genetic Predisposition or a Familial Relationship? (<i>Dört Alman Çoban Köpeğinde Hepatik Fibroz İdiyopatik, Genetik Yatkınlık ya da Ailesel İlişki mi?</i>) Hadi ALİHOSEİNİ, Ekrem Çağatay ÇOLAKOĞLU, Arif KURTDEDE, Ali Evren HAYDARDEDEOĞLU	501-507

Osteometric Examination of Skeletal Remains of Sheep Uncovered in Excavations Performed in Ancient City of Kibyra[#]

Yasin DEMİRASLAN^{1*}, İftar GÜRBÜZ¹, Ömer Gürkan DİLEK¹, Şükrü ÖZÜDOĞRU²,
Özcan ÖZGEL¹

¹ Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Mehmet Akif Ersoy University, Burdur, TURKEY

² Department of Archaeology, Faculty of Science and Literature, Mehmet Akif Ersoy University, Burdur, TURKEY

[#]The present study was supported by Mehmet Akif Ersoy University Commission for Scientific Research Projects (Project No: 0304-NAP-16). And this study was presented as oral paper at 1st International Veterinary Anatomy Congress of Turkey.

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

ABSTRACT

The aim of the study was to investigate the osteometric investigation of the remains of sheep skeleton from archaeological excavations in Kibyra Antique City located in Golhisar district of Burdur. In the study, the remains of the totally measurable 370 bones revealed in the archaeological excavations of Bouleuterion-Odeion, Stadion, Agora and Facade of the ancient city of Kibyra were used. The osteometric measurements were obtained from these bones. Moreover, the shoulder height and dimensions were estimated by using obtained data. According to this, the average of shoulder height of Kibyra sheep was determined as 59.8 cm. As a result, it was thought that the numerical data obtained in the study will contribute to the limited number zooarchaeological researches in our country.

Keywords: Kibyra, Osteometric, Sheep

Kibyra Antik Kenti Kazılarında Ortaya Çıkarılan Koyun İskeleti Kalıntılarının Osteometrik Olarak İncelenmesi

ÖZ

Çalışmada Burdur'un Gölhisar ilçesinde bulunan Kibyra Antik Kentindeki arkeolojik kazılardan ortaya çıkarılan koyun iskeleti kalıntılarının osteometrik olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada Kibyra Antik Kenti'nin Bouleuterion-Odeion, Stadion, Agora ve Dış Cephe arkeolojik kazılarında ortaya çıkarılan ölçü alınabilir nitelikte toplam 370 adet kemik kalıntısı kullanıldı. Bu kemiklerden osteometrik ölçüler alındı. Ayrıca elde edilen veriler kullanılarak koyunların cidago yüksekliği ve ebatları ile ilgili tahminde bulunuldu. Buna göre Kibyra koyunlarının ortalama cidago yüksekliği 59.8 cm olarak tespit edildi. Sonuç olarak çalışmada elde edilen sayısal verilerin Ülkemizde sınırlı sayıdaki zooarkeolojik çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kibyra, Koyun, Osteometri

To cite this article: Demiraslan Y. Gürbüz İ. Dilek Ö. G. Özüdoğru Ş. Özgel Ö. Osteometric Examination of Skeletal Remains of Sheep Uncovered in Excavations Performed in Ancient City of Kibyra[#]. *Kocatepe Vet J. (2018) 11(4): 344-355.*

INTRODUCTION

The Ancient City of Kibyra is located on three hills at the altitude of 1100-1300 meters on the piedmonts of the mount Akdag in the west of Gölhisar township on southwestern part of the province of Burdur (Aksu, 1998). The city is located on the junction point of Lycia, Phrygia, Karia, and Pisidia regions (Ekinçi et al., 2007). The region known as Kabalia/Kabalis in early periods (Ökmen, 2004) was started to be named as "Kibyrtis" as the city got stronger in Hellenistic Age and during domination of Rome (Hall and Milner, 1998, Milner, 1998). Ancient sources indicate that Kibyra was ruled by a tyrant named Moagetes in the first half of Century II B.C. and he established a Tetrapolis by interconnecting three cities around Kibyra (Shuckburgh, 1889; cited by Özüdoğru, 2014). Kibyra, whose name is written on Stadiasmus Patarensis (Patara Road) (Işık et al., 2001), was reconstructed by Tiberius after the earthquake occurring in 23 AD. The city was named as Caesarea Cibyra following the renovation. However, the city could not recover after the earthquake in 417 (Karabacak et al., 2009). Kibyra which was exposed to assaults by Goth and Arabs in this period was abandoned after 6th century (Bayburtluoğlu, 2004).

From past to present, bovine and ovine-caprine animals have been the most important resources of animal food. Animals from the family ruminantia are primary for meeting socio-economical needs thanks to yields of meat, milk, wool, skin, and fat (bone-organ). Skeletal remains of animals that are such involved in the daily life are comprised of the materials frequently found in archaeological excavations. Besides, these remains allow for comments about nourishment, economic and social life of their community and also lead us to do various estimations about morphological traits of the animals in that period of time (Onar et al., 2010). These estimations can be ranged as height at withers, body weight, gender, and age. Information obtained from archaeological bone material are also important for determination of fauna and comparisons with other historical processes, as well as estimations for morphological traits of the animals (Clark, 1995; Guintard and Lallemand, 2003; Harcourt, 1974; Onar, 2005).

Onar et al., (2013a) evaluated approximately 21000 remains of animal skeleton uncovered as a result of excavations of Yenikapı Metro and Marmaray starting in 2004. It was stated in the study that skeletal remains obtained belonged to about 54 species. Pazvant et al., (2015) investigated metapodial bones from sheep and goat uncovered in the same excavation site. In conclusion, sheep of

Byzantine Age were determined to be similar to Iron Age sheep in terms of shoulder height and to resemble Tuj sheep from modern sheep. Guintard and Lallemand (2003) suggested that data obtained from the study on 215 metapodia of sheep could provide an insight to history for domestication of sheep. In the study by Davis (1996) 42 different measurements were taken from leg bones of Shetland Sheep and findings were compared with data of sheep uncovered in archaeological excavations.

Above-mentioned literature information has shown that the number of studies on archaeological remains of animal skeleton is very limited in Turkey. The aim of the present study was to perform an osteometric examination on skeletal remains of sheep uncovered during archaeological excavations performed in Ancient City of Kibyra between 2006 and 2014.

MATERIALS and METHODS

Necessary permission was received from Department of Excavation of Ancient City of Kibyra to examine skeletal remains of various animals such as horse, cattle, sheep, goat, pig, cat, and dog were revealed during archaeological excavations performed in Ancient City of Kibyra between 2006 and 2014. For the method of the study, the study by Onar et al., (2010) was taken as the reference. Accordingly, skeletal remains uncovered from the excavation site were recorded considering grid depth and date. The skeletal remains were stored inside plastic cases in the excavation site. The skeletal remains that were kept in plastic cases in the excavation storage were transferred to the osteology laboratory. A total of 370 measurable skeletal remains uncovered in archaeological excavations performed in Bouleuterion / Odeion, Stadion, Agora, and Exterior Facade of Ancient City of Kibyra between 2006 and 2014 were examined in the present study. The codes of measurement for osteometric sizes were stated below. Osteometric measurements were recorded in the Microsoft Office Excel 2007 programme. Mean and standard deviation were calculated using Statistical Package for the Social Sciences (IBM, SPSS 20.0) packaged software.

Driesch (1976) was taken as reference for osteometric measurements. The "Teichert's multipliers" (Teichert, 2005) were utilised to calculate height at withers for sheep of Kibyra. In addition, Bp/GL*100, SD/GL*100, and Bd/GL*100 indices were calculated using osteometric measurements for metapodia of sheep in the study (Berteux and Guintard, 1995; Guintard and Lallemand, 2003; Davis, 1996).

While “Nomina Anatomica Veterinaria (2012)” was mainly based to write anatomic terms in the study, commonly used literature was based for some osteoarcheological terms.

General Measurement Codes

GL: Maximum length, GB: Maximum width, Bd: Maximum width of distal end, Bp: Maximum width of proximal end, SD: Minimum width of diaphysis, Dd: Maximum depth of distal end.

Measurement Codes of Mandibula

LA: Length of angulus, L3: Aboral edge length of gonion caudale and 3rd molar tooth, LHR: Length of corpus mandibulae, L5: Oral edge length of gonion caudale and 1st premolar tooth, GCM: Length between gonion caudale and foramen mentale, LCR: Length of arch of cheek teeth, LMR: Length of molar teeth, LPR: Length of premolar teeth, LM₃: Length of 3rd molar tooth, BM₃: width of 3rd molar tooth, LD: Length of diastema, HRcd₁: 1st condylar height of ramus of mandible, HRcd₂: 2nd condylar height of ramus of mandible, HRcr: Processus coronoideus height of ramus of mandible, AHVR: Aboral height of ramus of mandible, MHVR: Molar height of ramus of mandible, OHVR: Oral height of ramus of mandible.

Measurement Codes of Vertebrae

BFcr: Width of facies articularis cranialis, BFcd: Width of facies articularis caudalis, GLF: Distance between facies articularis cranialis et caudalis, H: Height, GLPa: Distance between processus articularis cranialis et caudalis, BPacr: Width of processus articularis cranialis, BPacd: Width of processus articularis caudalis, PL: Length of corpus, HFcr: Height of facies terminalis cranialis, HFcd: Height of facies terminalis caudalis, SBV: Minimum width of vertebra, LCDe: Length of corpus as from dens, LAPa: Length of arcus.

Measurement Codes of Scapula

SLC: Minimum length of collum scapulae, GLP: Maximum length of processus articularis, LG: Length of cavitas glenoidalis, BG: Width of cavitas glenoidalis.

Measurement Codes of Humerus

BT: Maximum width of trochlea humeri.

Measurement Codes of Radius

BFd: Maximum width of facies articularis distalis.

Measurement Codes of Ulna

LO: Length of olecranon, DPA: Depth of processus anconaeus, SDO: Minimum depth of olecranon, BPC: Width of processus coronoideus.

Measurement Codes of Os coxae

LA: Length of Acetabulum, SH: Minimum height of corpus ossis ilium, SB: Minimum width of corpus ossis ilium.

Measurement Codes of Femur

DC: Maximum depth of caput femoris.

Measurement Codes of Talus

GLI: Maximum length of lateral half, GLm: Maximum length of medial half, DI: Maximum depth of lateral half, Dm: Maximum depth of medial half.

Measurement Codes of Metapodium

d: Medial corpus width of diaphysis, e: Medial corpus depth of diaphysis, DD: Minimum depth of diaphysis, Be: Maximum width of metaphysis, De: Maximum depth of metaphysis, DIM: Dorsopalmar/plantar diameter of internal trochlea of condylus medialis, DEM: Dorsopalmar/plantar diameter of external trochlea of condylus medialis, DIL: Dorsopalmar/plantar diameter of internal trochlea of condylus lateralis, DEL: Dorsopalmar/plantar diameter of external trochlea of condylus lateralis, WCM: Medio-lateral width of condylus medialis, WCL: Medio-lateral width of Condylus lateralis.

Measurement Codes of Phalanx proximalis et media

GLPe: Maximum length of periferal (abaxial) half.

RESULTS

Table 1-7 shows osteometric values of sheep bones remains examined in the present study.

Table 6 shows the data calculated using maximum lengths of talus (astragalus), calcaneus (os calcis), os metacarpale III et IV, and os metatarsale III et IV for height at withers. Accordingly, mean height at withers was determined as 59.8 cm for sheep.

Bp/GL*100, SD/GL*100 and Bd/GL*100 indices were calculated using osteometric measurements for metapodia of sheep in the study. Table 7 shows index results of metapodia.

Table 1. Osteometric measurements of mandibula in Kibyra sheep (The values are mm.)

Measurement	N	Minimum	Maximum	Mean	SD
LA	2	149.2	181.2	165.2	22.6
L3	3	46.1	53.6	49.8	3.8
LHR	2	104.8	128.4	116.6	16.7
L5	1	110.1	110.1	110.1	
GCM	2	125.1	146.6	135.9	15.2
LCR	7	49.4	76.6	69.0	9.7
LMR	8	29.7	91.5	44.5	19.4
LPR	11	20.4	45.7	32.4	6.7
LM ₃	6	20.8	37.7	25.5	6.2
BM ₃	6	7.0	13.5	9.6	2.2
LD	11	26.7	41.8	31.5	4.2
HRcd ₁	3	73.1	89.5	79.4	8.8
HRcd ₂	3	64.7	81.2	72.1	8.4
HRcr	1	107.8	107.8	107.8	
AHVR	10	35.4	71.5	42.3	10.5
MHVR	8	13.7	28.4	23.0	4.5
OHVR	21	9.3	18.6	14.6	2.4

Table 2. Osteometric measurements of vertebrae in Kibyra sheep (The values are mm.)

Measurement	N	Minimum	Maximum	Mean	SD
Atlas					
GL	1	42.9	42.9	42.9	
BFcd	1	37.7	37.7	37.7	
GLF	1	37.5	37.5	37.5	
GB	1	55.7	55.7	55.7	
H	3	30.4	31.3	30.7	0.5
Axis					
BFcd	1	21.5	21.5	21.5	
BFcr	1	38.1	38.1	38.1	
SBV	1	22.6	22.6	22.6	
LCDe	1	54.8	54.8	54.8	
LAPa	1	41.4	41.4	41.4	
H	1	38.0	38.0	38.0	
Vertebrae cervicalis					
GLPa	2	35.6	36.5	36.1	0.6
BPacr	1	31.1	31.1	31.1	
BPacd	2	31.7	33.4	32.6	1.2
PL	1	36.5	36.5	36.5	
HFcr	1	15.2	15.2	15.2	
HFCcd	1	17.4	17.4	17.4	
H	1	30.9	30.9	30.9	
Vertebrae lumbalis					
PL	5	25.4	32.1	29.0	2.7
BFcr	4	20.4	23.3	21.4	1.4
BFcd	4	20.7	27.3	24.4	2.7
HFcr	4	13.1	14.5	13.9	0.6
HFcd	4	11.3	13.6	12.6	1.2
H	1	39.8	39.8	39.8	

Table 3. Osteometric measurements of fore-limb bones in Kibyra sheep (the values are mm.)

Measurement	N	Minimum	Maximum	Mean	SD
Scapula					
SLC	6	18.7	24.8	22.0	2.1
GLP	9	28.7	39.7	33.8	3.2
LG	9	21.4	31.2	26.4	2.9
BG	9	18.5	27.8	22.8	3.0
Humerus					
BT	21	24.1	31.8	27.2	2.2
Bd	22	26.5	34.6	29.8	2.2
Radius					
SD	11	13.7	18.0	15.9	1.7
Bd	11	25.7	34.5	28.7	3.0
BFd	11	20.1	26.2	23.3	2.1
Bp	14	22.5	35.3	29.7	3.6
Ulna					
DPA	6	29.5	32.6	31.1	2.2
BPC	6	17.2	19.0	18.1	1.3
SDO	4	20.4	23.3	21.9	2.1
LO	2	34.5	41.8	38.2	5.2
Metacarpus					
GL	3	119.1	126.2	121.5	4.1
Bp	28	20.4	29.4	24.2	1.9
d	20	11.4	18.3	15.4	2.1
e	20	9.1	12.2	10.8	0.8
SD	8	12.5	16.8	14.9	1.5
DD	8	8.8	11.8	9.9	1.1
Bd	9	22.6	28.1	25.3	2.1
Dd	9	14.1	18.2	15.8	1.4
Be	12	2.8	30.9	24.3	7.1
De	12	11.4	16.3	13.6	1.4
DIM	2	13.7	15.8	14.8	1.5
DEM	2	10.8	11.3	11.1	0.4
DIL	3	14.1	15.1	14.7	0.5
DEL	3	10.6	11.6	11.0	0.6
WCM	2	11.8	13.3	12.6	1.1
WCL	3	11.0	14.0	12.6	1.5

Table 4. Osteometric measurements of hind-limb bones in Kibyra sheep (The values are mm.)

Measurement	N	Minimum	Maximum	Mean	SD
Os coxae					
LA	14	23.1	31.6	26.4	2.3
SB	2	6.8	9.6	8.2	2.0
SH	2	12.3	13.9	13.1	1.1
Femur					
DC	1	19.1	19.1	19.1	
Bp	1	39.9	39.9	39.9	
Bd	2	36.1	37.8	37.0	1.2
Tibia					
Bd	27	22.1	32.4	25.8	2.5
Dd	27	17.0	24.8	19.5	1.8
SD	11	10.6	18.2	12.3	2.1
Calcaneus					
GL	15	51.0	62.7	54.9	3.5
GB	20	13.9	22.4	16.9	2.1
Talus					
GLm	18	24.0	38.5	27.2	3.2
GLl	19	25.6	40.8	29.2	3.2
Bd	18	16.7	23.8	18.6	1.5
Dm	17	13.4	21.9	16.1	1.9
DI	18	14.1	22.1	15.7	1.7
Metatarsus					
GL	5	110.3	126.6	118.9	6.1
Bp	37	17.7	25.0	20.7	1.6
d	14	9.5	16.2	12.3	1.7
e	14	8.1	14.0	11.3	1.5
SD	13	9.3	16.1	11.9	1.9
DD	12	8.0	12.1	9.9	1.0
Bd	9	23.6	27.2	24.7	1.1
Dd	8	14.6	17.2	15.7	0.9
Be	11	22.0	27.0	23.4	1.7
De	11	12.5	14.5	13.3	0.5
DIM	5	12.1	14.2	13.3	0.8
DEM	5	9.2	10.6	9.8	0.6
DIL	4	12.3	14.1	13.4	0.8
DEL	4	8.5	11.4	10.0	1.2
WCM	5	10.4	11.2	10.9	0.3
WCL	4	10.5	12.3	11.1	0.8

Table 5. Osteometric measurements of phalanx and metapodials in Kibyra sheep (The values are mm.)

Measurement	N	Minimum	Maximum	Mean	SD
Metacarpus-Metatarsus					
Be	2	22.6	24.2	23.4	1.1
De	2	12.9	13.4	13.2	0.4
Dd	2	15.3	16.7	16.0	1.0
Bd	2	23.3	25.9	24.6	1.8
Phalanx proximalis					
GLPe	17	27.3	46.0	36.9	5.2
SD	19	8.8	13.1	11.1	1.0
Bp	19	11.1	15.0	13.5	1.1
Bd	17	9.9	15.1	13.3	1.6
Phalanx media					
GL	4	27.3	29.6	28.5	1.1
Bp	4	14.2	15.1	14.5	0.4
SD	4	9.6	10.2	9.9	0.3
Bd	4	11.0	11.6	11.3	0.3

Table 6. The data of shoulder height of Kibyra sheep (The values are cm.)

Bone	N	Minimum	Maximum	Mean	SD
Metacarpus	6	50.1	62.2	55.4	4.2
Metatarsus	7	48.8	61.7	55.2	4.8
Talus	19	58.1	92.5	66.2	7.3
Calcaneus	15	58.1	71.5	62.6	4.0

Table 7. Index values of metapodials of Kibyra sheep

Bone	Index	N	Minimum	Maximum	Mean	SD
Metacarpus	Bp/GL*100	6	19.7	22.4	21.2	1.1
	SD/GL*100	6	10.4	13.1	12.1	0.9
	Bd/GL*100	6	0.0	25.5	19.5	9.7
Metatarsus	Bp/GL*100	5	16.5	18.4	17.5	0.7
	SD/GL*100	5	9.2	11.2	10.0	0.8
	Bd/GL*100	5	0.0	21.7	16.9	9.5

DISCUSSION and CONCLUSION

Zoarcheological studies mentioned about sheep in 2 types of sizes in Europe (Bogolubski, 1968; Bökönyi, 1983). Adametz (1925) defined especially

small sheep of Neolithic Europe as "Ovis palustris" with height at withers lower than 60 cm. Furthermore, "Ovis musimon" occurring in the Copper Age, which was 10 cm higher than the first type, was mentioned as the second type (Lasota-

Moskalewska et al., 1998). Lasota-Moskalewska et al., (1998) classified sheep as follows; small sized sheep having a height at withers of up to 59.9 cm, medium sized sheep having a height at withers of 60-69.9 cm, and large sized sheep having a height at withers of 70 cm and higher. In addition, Lasota-Moskalewska et al., (1998) stated in their study that the height at withers calculated from bone remains excavated in southern Turkey was 67.2 (n: 12), 66.2 (n: 16), 62.2 (n: 11), and 62.6 cm (n: 32) in average for periods I and IV (2000 B.C. –500 A.D.), respectively. It was determined that these values were compatible with calculations of talus and calcaneus obtained in the present study but, they were not compatible with metapodia.

Pazvant et al., (2015) examined metapodia of sheep and goat uncovered from excavation site of Yenikapı Metro and Marmaray (Istanbul). In conclusion, it was determined that sheep of Byzantine age and Iron age were similar in shoulder height and were similar to Tuj sheep from sheep of modern age. Additionally, the coefficient of variation for (CV%) data of metapodia of Kibyra, Morkaraman and Tuj sheep were also presented in Tables 8, 9, 10, and 11 by adding into information given in this study (Pazvant et al., 2015).

Piatkowska-Malecka and Mogorzewska (2009) investigated 2381 mammalian bones uncovered in

archaeological excavations executed in Tell Arbid (Syria) and classified 1272 of them. Osteometric data of sheep bones in this study and the present study are comparatively given in Table 12. According to this, it was shown that the GL1 value of talus of sheep from Kibyra was lower.

Mulville and Powell (1997) examined 1527 bone remains uncovered in excavations performed in Segsbury and reported that 49 (NISP%:22) of these bone remains were cattle, 11 (NISP%:4) were sheep, 166 (NISP%:74) were sheep-goat. In this study also osteometric values for some bones were calculated. The data of the study (Mulville and Powell, 1997) and the project are represented in Table 13 comparatively. Accordingly, it was observed that the Bd and B'T values of humerus of sheep from Kibyra was higher.

In conclusion, skeletal remains of sheep uncovered in archaeological excavations executed in Ancient City of Kibyra were examined osteometrically in the present study. It is a fact that bones of animals consumed need to be evaluated as a zooarcheological material with specific terminology rather than being an ordinary relict. Owing to numeric and metric data, the present study is thought to contribute to limited number of zooarcheological studies in Turkey.

Table 8. Comparison of the coefficient of variation of osteometric measurements of metacarpus with modern and archeological data of Kibyra sheep

Kibyra		Yenikapı-Marmaray (Pazvant ve ark., 2015)		Morkaraman (Demiraslan ve ark., 2015)				Tuj (Demiraslan ve ark., 2015)				Kıvırcık (Bacınoğlu, 2006)			
				Female		Male		Female		Male		Female		Male	
Order	%CV	Order	%CV	Order	%CV	Order	%CV	Order	%CV	Order	%CV	Order	%CV	Order	%CV
GL	3.4	DD	12.03	Bd	12.93	De	9.71	Be	11.67	DIL	14.22	SD	7.77	SD	8.2
Bp	8.0	SD	11.92	Dd	9.17	WCM	4.49	De	10.89	De	9.72	DEM	7.33	e	7.92
D	13.4	DEL	10.7	De	8.17	DD	4.01	Dd	8.13	WCL	7.26	Dd	7.23	DD	7.84
E	7.2	DEM	10.52	DD	7.33	DEL	3.92	SD	6.33	WCM	7	d	7.07	d	7.68
SD	9.9	d	10.32	SD	5.36	SD	3.64	GL	5.35	DEM	5.51	De	7.03	Be	6.27
DD	11.1	e	10.25	e	4.37	Be	3.63	DIL	5.23	SD	5.12	DIL	7.01	DIL	5.51
Bd	8.1	De	10.03	DEM	4.35	Dd	3.61	DEL	5.21	DD	5.08	DEL	6.91	De	5.48
Dd	8.8	Bp	10	Be	4.23	e	3.43	e	5.2	Be	4.87	DIM	6.82	DIM	5.34
Be	29.2	WCL	9.87	d	3.64	DIM	3.42	d	5.19	Bp	4.85	Bp	6.63	DEL	5.15
De	9.9	WCM	9.55	WCL	3.22	DIL	2.85	Bp	5.1	GL	4.63	WCM	6.48	WCL	5
DIM	10.1	DIL	9.4	DEL	3.08	DEM	2.66	Bd	4.9	Dd	4.14	WCL	6.17	WCM	4.97
DEM	3.2	Bd	9.31	WCM	2.99	GL	2.61	WCL	4.8	d	4.1	Be	6.04	DEM	4.96
DIL	3.6	DIM	9.06	GL	2.56	WCL	2.59	DIM	4.51	Bd	3.98	DD	6.02	Bp	4.92
DEL	5.0	Be	8.93	DIM	2.47	Bp	2.56	DEM	4.15	DEL	3.97	Bd	6	Bd	4.73
WCM	8.5	GL	8.84	Bp	2.2	d	2.42	WCM	3.85	DIM	3.85	e	5.66	Dd	4.59
WCL	12.0	Dd	8.69	DIL	2.06	Bd	2.03	DD	2.91	e	3.16	GL	5.34	GL	3.97
		Dp	8.4												

Table 9. Comparison of the coefficient of variation of osteometric measurements of metacarpus with modern and archeological data of Kibyra sheep (Continuation of Table 8)

Lallemand, 2002		Guintard ve Lallemand, 2003				Davis, 1996		Anzaf Kalesi (Onar ve ark.,2008)			
Female		Male		Female		Male		Female			
Order	%CV	Order	%CV	Order	%CV	Order	%CV	Order	%CV	Order	%CV
d	15.04	d	19.61	d	15.04	d	19.61	DEM	5.8	De	7.84
SD	14.52	SD	18.85	SD	14.52	SD	18.85	DEL	5.4	DD	7.34
Bp	10.79	e	15.24	Bp	10.79	e	15.24	SD	5	SD	6.92
GL	9.56	DD	14.32	GL	9.56	DD	14.32	DIL	4.9	e	6.74
e	9.55	Bp	13.76	e	9.55	Bp	13.76	DIM	4.7	Dd	6.38
DD	9.37	Dp	13.32	DD	9.37	Dp	13.32	Bp	3.9	GL	6.36
Be	9.07	WCL	13.09	Be	9.07	WCL	13.09	GL	3.8	Be	5.64
Dp	8.56	Be	12.98	Dp	8.56	Be	12.98	WCM	3.6	Bp	5.61
WCM	8.42	DEL	12.75	WCM	8.42	DEL	12.72	WCL	3.6	Dp	5.21
DEL	8.32	WCM	12.69	DEL	8.32	WCM	12.69	Bd	3	Bd	4.13
De	8.21	DEM	12.32	De	8.21	DEM	12.32				
DEM	8.14	Bd	11.96	DEM	8.14	Bd	11.96				
WCL	8.04	DIM	11.75	WCL	8.04	DIM	11.75				
Bd	7.79	DIL	11.74	Bd	7.97	DIL	11.74				
Dd	7.73	GL	11.58	Dd	7.73	GL	11.58				
DIL	7.36	De	11.24	DIL	7.36	De	11.24				
DIM	7.18	Dd	9.97	DIM	7.18	Dd	9.97				

Table 10. Comparison of the coefficient of variation of osteometric measurements of metatarsus with modern and archeological data of Kibyra sheep

Kibyra		Yenikapı-Marmaray (Pazvant ve ark., 2015)		Morkaraman (Demiraslan ve ark., 2015)				Tuj (Demiraslan ve ark., 2015)				Kıvırcık (Bacınoğlu, 2006)			
				Female		Male		Female		Male		Female		Male	
Order	%CV	Order	%CV	Order	%CV	Order	%CV	Order	%CV	Order	%CV	Order	%CV	Order	%CV
GL	5.1	DD	8.49	Be	14.81	De	6.5	WCM	11.69	DEM	9.3	DEM	8.88	e	8.58
Bp	7.7	d	8.33	De	10.13	e	4.66	Dd	8.08	WCM	5.86	d	7.84	d	7.69
d	14.2	De	8.2	d	7.48	DEL	3.81	GL	6.12	DIM	4.98	DIM	7.73	DD	7.47
e	13.1	SD	8.05	Dd	7.33	DIL	3.73	d	6.11	De	4.81	De	7.67	SD	7.39
SD	16.2	GL	7.89	SD	6.76	WCL	3.72	De	5.98	DEL	4.47	SD	7.52	De	6.67
DD	10.1	e	7.86	DEM	6.08	Dd	3.57	SD	5.27	DIL	4.35	WCL	7.25	Be	5.86
Bd	4.6	DEM	7.47	DEL	6.01	Be	3.26	Bp	5.1	e	4	Dd	7.09	DEL	5.82
Dd	5.9	DEL	7.38	e	5.92	DD	2.95	DIL	5.1	GL	3.99	DEL	6.97	DIL	5.6
Be	7.2	Dd	7.1	DD	5.46	d	2.91	DIM	5.02	Dd	3.9	DIL	6.88	Dd	5.36
De	4.0	Dp	6.98	WCL	4.91	Bp	2.88	DD	4.95	Bd	3.86	WCM	6.63	DEM	5.33
DIM	6.1	Bp	6.78	Bd	4.16	Bd	2.62	WCL	4.94	Be	3.73	Bp	6.5	DIM	5.32
DEM	5.9	Be	6.64	WCM	3.83	WCM	2.2	Bd	4.88	WCL	3.64	DD	6.38	WCL	5.19
DIL	5.8	DIL	6.57	Bp	3.39	GL	2.06	Be	4.8	d	3.07	Be	6.23	Bp	5.03
DEL	12.2	DIM	6.57	GL	3.38	DEM	1.69	DEL	4.58	SD	2.57	e	6.11	Bd	5.01
WCM	3.2	WCM	6.33	DIM	3.28	DIM	1.47	e	4.23	DD	2.49	Bd	6.06	WCM	4.85
WCL	7.2	WCL	6.05	DIL	2.28	SD	1.27	DEM	4.13	Bp	2.31	GL	5.55	GL	4.11
		Bd	5.91												

Table 11. Comparison of the coefficient of variation of osteometric measurements of metatarsus with modern and archeological data of Kibyra sheep (Continuation of Table 10)

Lallemand, 2002		Guintard ve Lallemand, 2003				Davis, 1996		Anzaf Kalesi (Onar ve ark.,2008)			
Female		Male		Female		Male		Female			
Order	%CV	Order	%CV	Order	%CV	Order	%CV	Order	%CV		
d	13.73	d	18.54	d	13.73	d	18.54	SD	5.1	DD	9.36
SD	12.66	SD	17.68	SD	12.66	SD	17.68	DIL	4.9	SD	8.32
e	11.49	DEM	16.83	e	11.49	DEM	16.83	DIM	4.4	e	8.29
GL	10.41	e	16.64	GL	10.41	e	16.64	GL	4.1	Dp	8.04
DEM	10.2	DEL	16.3	DEL	10.2	DEL	16.3	Bd	3.2	De	7.86
DEL	10.2	DD	16.14	DEM	10.2	DD	16.14			GL	7.71
DD	10.18	Bp	15.3	DD	10.18	Bp	15.3			Be	7.26
Dp	10.04	Dp	15.16	Dp	10.04	Dp	15.16			Bp	5.95
WCM	9.99	DIL	14.82	WCM	9.9	DIL	14.82			Dd	5.81
WCL	9.96	GL	14.55	WCL	9.96	GL	14.55			Bd	5.45
Bp	9.95	WCL	14.47	Bp	9.95	WCL	14.47				
Be	9.52	DIM	14.45	Be	9.52	DIM	14.45				
Dd	9.44	De	14.39	Dd	9.44	De	14.39				
De	9.17	Be	14.23	De	9.17	Be	14.23				
Bd	8.95	WCM	14.23	Bd	8.95	WCM	14.23				
DIL	8.5	Bd	13.71	DIL	8.5	Bd	13.71				
DIM	8.25	Dd	12.91	DIM	8.25	Dd	12.91				

Table 12. Osteometric data of bone remains of ruminantia in Tell Abrid (VIIC; Early Jazeera, VIIB; Early Dynastic, VIIA; Akkadian, VI; PostAkkadian, M: Modern, K: Kibyra. The values are mm.)

Kemik	Order	VIIC	VIIC/VIIB	VIIB	VIIA/VI	M	K
Talus	GLI	31	32	29		29	27.2
	Bp	20	20	18		21	
Humerus	Bd				32		29.8

Table 13. Comparison of osteometric data of bone remains in Segsbury and Kibyra (The values are mm.)

Humerus	Bd		BT	
	Kibyra	Segsbury	Kibyra	Segsbury
	29.8	28.4	27.2	27
Radius	Bp		BFp	
	Kibyra	Segsbury	Kibyra	Segsbury
	29.7	25.2		23.7

REFERENCES

- Adametz L.** Hodowla ogólna zwierząt domowych [Polska Akademia Umiejętności]. Kraków. 1925.
- Aksu F.** Gölhisar Ovası ve Yakın Çevresinde Fiziki Coğrafya Araştırmaları. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, İzmir, 1998.
- Bacınoglu D.** Kıvrıkcık Irkı Koyunlarda Metapodium'ların Morfometrik ve Stereolojik Metotlarla İncelenmesi. Doktora Tezi, İstanbul Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2006.
- Bayburultuoglu C.** Likya, Akmed Yay. 2004; Antalya.
- Berteaux D, Guintard C.** Osteometric study of the metapodials of Amsterdam Island feral cattle. *Acta Theriol.* 1995; 40, 97-440.
- Bogolubski S.** Pochodzenie i ewolucja zwierząt domowych. Warszawa. 1968.
- Bökönyi S.** Domestication, dispersal and use of animals in Europe in: Domestication, conservation and use of animal resources. L. Peel, D.E. Tribe eds. Amsterdam. 1983; pp: 1-20.
- Clark KM.** The later prehistoric and protohistoric dog: the emergence of canine diversity. *Archaeozoologia.* 1995; 7: 9-32.
- Davis SJM.** Measurements of a Group of Adult Female Shetland Sheep Skeletons from a single flock: a baseline for zooarchaeologists. *J Archaeol Sci.* 1996; 23, 593-612.
- Demiraslan Y, Gürbüz I, Aslan K, Akbulut Y.** The stereological and morphometrical analysis of metapodium in Tuj and Morkaraman sheep. *AJAVS.* 2015; 1(1): 12-23.
- Driesch von den A.** A Guide to the Measurement of the Animal Bones from Archaeological Sites. Peabody Museum Bulletin. Harvard University. Massachusetts. 1976.
- Ekinci HA, Özudogru Ş, Dökü FE, Tiryaki G.** Kibyra Kazı Çalışmaları 2006. *Anmed.* 2007; 5: 22-28.
- Guintard C, Lallemand M.** Osteometric study of metapodial bones in sheep (*Ovis aries*, L. 1758). *Ann Anat.* 2003; 185,573-583.
- Hall AS, Milner NP.** An Epigrafical Survey in Kibyra. Olbasa Region, The British Institute of Archaeology Monograph. Ankara. 1998; 24.
- Harcourt RA.** The dog in prehistoric and early historic Britain. *J Archaeol Sci.* 1974; 1:151-175.
- Işık F, Işkan H, Çevik N.** Patara Yol Kılavuz Anıtı. Lykia IV. Antalya. 2001 1998/1999.
- Karabacak V, Altunel E, Akyüz S, Kıyak NG, Yönlü Ö, Yalçınler CÇ.** Fethiye-Burdur Fay Zonu Üzerindeki Kibyra Antik Kentinde Tarihsel Deprem İzlerinin Arkeosismolojik ve Paleosismolojik Yöntemler Kullanılarak İncelenmesi, 200815006 No'lu Proje Sonuç Raporu, Eskişehir Osman Gazi Üniversitesi, Eskişehir, 2009.
- Lallemand M.** Etude Osteometrique de Metapodes de Mouton (*Ovis aries* L). PhD Thesis, Ecole Nationale Veterinaire de Nantes, Nantes, 2002.
- Lasota-Moskalewska A, Kobryn H, Swiezynski K.** The size of domestic sheep (*Ovis Aries*, L.) in Europa and Asia from the neolithic to the middle ages. *Swiatowit.* 1998; 41, 323-348.
- Milner NP.** An Epigraphical Survey in the Kibyra - Olbasa Region, conducted by A. S. Hall. The British Institute of Archaeology at Ankara (B.I.A.A.) Monograph 24. Oxford 1998.
- Mulville J, Powell A.** Excavations at Segsbury Camp: the Iron Age Animal Bone.(1997).Erişim:<http://www.arch.ox.ac.uk/files/Research%20Projects/Hillforts/Segsbury/animalbone4.pdf>
- Nomina Anatomica Veterinaria,** Fifth ed. Revised version, Prepared by the International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature and Published by the Editorial Committee, Hannover, Columbia, Gent, Sapporo, 2012.
- Onar V, Belli O.** Estimation of shoulder height from long bone measurements on dogs unearthed from the Van-Yoncatepe early Iron Age necropolis in Eastern Anatolia. *Rev Med Vet.* 2005; 156: 53-60.
- Onar V, Pazvant G, Alpak H, Armutak A, Gezer İnce N, Kızıltan ZS.** A Bridge from Byzantium to Modern Day Istanbul: An Overview of Animal Skeleton Remains Found During Metro and Marmaray Excavations. *Istanbul Univ. Vet. Fak. Derg.* 2013a; 39: 1-8.
- Onar V, Pazvant G, Armutak A, Alpak H.** Yenikapı Metro ve Marmaray Kazılarında Ortaya Çıkarılan Hayvan İskelet

Kalıntılarının İncelenmesi, Proje Sonuç Raporu, İstanbul, 2010.
http://uvt.ulakbim.gov.tr/uvt/index.php?cwid=9&vtadi=TPRJ&ano=136545_9ad5d0f304b2c84e67869df7e5f8b408

Onar V, Pazvant G, Belli O. Osteometric examination of metapodial bones in sheep (*Ovis aries* L.) and goat (*Capra hircus* L.) unearthed from the Upper Anzaf Castle in Eastern Anatolia. *Rev Med Vet-Toulouse*. 2008; 159, 150-158.

Ökmen M. Herodot Tarihi (Çeviri). İstanbul. 2004.

Özüdoğru Ş. Kibyra'dan Hellenistik Dönem'e Ait Yeni Veriler Üzerine Değerlendirmeler. *Cedrus II*. 2014; 171-188.

Pazvant G, Onar V, Alpak H, Gezer İnce N, Kahvecioğlu KO, Armutak A, Kızıltan ZS. Osteometric examination of metapodial bones in sheep (*Ovis aries* L.) and goat (*Capra hircus* L.) unearthed from the Yenikapı Metro and Marmaray excavations in İstanbul. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2015; 21: 147-153.

Piatkowska-Malecka J, Mogorzewska A. Animal bone remains from Tell Arbid (season 2009) — Archaeozoological analysis, *PAM*. 2010; 22, 439–450.

Shuckburgh ES. The Histories of Polybius. Vol II. New York 1889.

Teichert M. Vergleich zwischen gemessener und berechneter Widerristhöhe bei einem Deutschen Schwarzbunten (Holstein) Milchrind. *Antropologia-Arkeologia*. 2005; 57, 483-486.

Pırlak Koyunlarında BMPR1B, BMP15 ve GDF9 Genlerinde Olası Polimorfizmlerin Araştırılması[#]

Koray ÇELİKELOĞLU^{1*}, Metin ERDOĞAN², Özlem HACAN¹, Serdar KOÇAK¹, Zehra BOZKURT¹, Mustafa TEKERLİ¹

¹Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Zootekni A.D, Afyonkarahisar

²Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Medikal Biyoloji ve Genetik A.D, Afyonkarahisar

[#]Bu çalışma AKÜ BAPK birimi tarafından 16.KARİYER.135 nolu proje ile desteklenmiştir.

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

ÖZ

Bu araştırmada, Afyonkarahisar İli Damızlık Koyun-Keçi Yetiştiricileri Birliği damızlık istasyonunda 2016 ve 2017 yıllarında çoklu ve tekli doğum yapanlardan sekizer baş olmak üzere toplam 16 baş Pırlak koyunda Bone Morphogenetic Protein Receptor type 1B (BMPR1B), Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) ve Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) genlerindeki polimorfizmin varlığı ve bunun tespit edilmesi durumunda çoklu doğumla ilişkilendirilmesi amaçlanmıştır. Genetik çalışmalarda kullanılmak üzere toplanan kan örnekleri hayvanların *V. jugularis*'lerinden EDTA'lı vakumlu tüplere alınmış ve genomik DNA izolasyon kiti kullanılarak DNA izolasyonları yapılmıştır. İlgili genler yönünden gerçekleştirilen PCR ve DNA dizileme analizleri sonucunda her üç gen yönünden de Pırlakların monomorfik yapıda olduğu ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Pırlak, Döl verimi, BMPR1B, BMP15, GDF9

Investigation of Possible Polymorphisms in BMPR1B, BMP15 and GDF9 Genes in Pırlak Sheep

ABSTRACT

This study was realised to determine the presence of polymorphism in major proliferation genes named Bone Morphogenetic Protein Receptor type 1B (BMPR1B), Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) and Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) of 8 uniparous and 8 multiparous Pırlak sheep reared at Sheep and Goats Breeders Association's Breeding Station, Afyonkarahisar between 2016 and 2017. Blood samples collected for using in genetic studies were taken from *V. jugularis* of animals into EDTA vacuum tubes and DNA isolations were performed using genomic DNA isolation kit. The PCR and DNA sequencing analyzes carried out on the basis of the respective genes revealed that Pırlaks are monomorphic in the aspect of above mentioned genes.

Keywords: Pırlak, Proliferacy, BMPR1B, BMP15, GDF9

To cite this article: Çelikeloglu K, Erdoğan M, Hacan Ö, Koçak S, Bozkurt Z, Tekerli M. Pırlak Koyunlarında BMPR1B, BMP15 ve GDF9 Genlerinde Olası Polimorfizmlerin Araştırılması. Kocatepe Vet J. (2018) 11(4): 356-362.

GİRİŞ

Yağlı kuyruklu Dağlıçlar ile yağsız kuyruklu Kıvırcıkların melezlenmesi sonucunda Pırlaklar elde edilmiştir. Bu ırk orta irilikte olup renk beyaz, göz etrafında, kulak uçlarında ve ağız etrafında siyah lekelerle rastlanır. Ayakları siyah lekeli olanlar da görülmektedir. Kulaklar yere paralel ve ileriye doğrudur. Erkekler yanlara doğru açılan güçlü spiral boynuzlara sahiptir. Dişiler genel olarak boynuzsuzdur. Kuyruk inceden yarı yağlıya kadar farklılık göstermektedir. Kuyruk yağı uyluktan uca doğru azalan bir yapıdadır. Pırlakların çevre şartlarına direnç bakımından Kıvırcıklara ve kültür koyunlarına, canlı ağırlık ve kuzu verimi bakımından da Dağlıçlara göre daha üstün performans göstermesi nedeniyle yaygınlığının arttığını ve kesim kuzusu elde etmek amacıyla yetiştiricilerce tercih edildiklerini belirtmiştir (Çelikeloğlu 2012). Afyonkarahisar ili Şuhut ilçesinde yürütülen Pırlakların Halk Elinde Islahı-I projesinin sonuç raporunda 2015 - 2016 doğum sezonu için doğuran koyun başına düşen kuzu sayısı elit sürülerde 1.59 bildirilmiştir (Teklerli ve ark. 2016).

Verim yönü et olan koyun yetiştiriciliğinin karlılığı kuzuların ağırlığına ve sayısına bağlıdır. Bu nedenle, seleksiyon genellikle bu özellikler üzerinde yoğunlaşmaktadır (Tosh ve Kemp 1994). Fertilité özelliğinin kuzu eti üretiminde karlılık ve verim anlamında büyük etkisi bulunmaktadır (Kumm 2008). Koyunlarda, ovülasyon oranı ve bir doğumdaki kuzu sayısı, fertilité özelliği için yüksek ekonomik öneme sahiptir (Notter 2008). Fertilité ile ilişkili özelliklerin genellikle kalıtım derecelerinin düşük olması nedeniyle bu yönlü ıslahta moleküler tekniklerin kullanılması ve sonuçların sayısal verilerle birleştirilmesi önem kazanmaktadır. Ayrıca koyunlarda ovülasyon oranı ve bir doğumdaki kuzu sayısı sadece dişi cinsiyet üzerinde ve ancak doğum yaptıktan sonra gözlemlenebilmektedir. Bu durumda ıslah sürecinin uzaması nedeniyle moleküler tekniklerin kullanımı ağırlık kazanmaktadır (Pramod ve ark. 2013).

Koyunlarda çoklu doğum özelliğine ait major genler üzerindeki genetik mutasyonlar ovülasyon oranını ve bir doğumdaki kuzu sayısını artırmaktadır (Karlı ve ark. 2012). Ovaryum'dan elde edilmiş Transforming Growth Factor- β (TGF β) süper familyasına ait BMPR1B, BMP15 ve GDF9 genleri ovülasyon oranına etkilidir (Pramod ve ark. 2013). Bu genlerin tek bir allelindeki mutasyon özelliğın ekspresyonu için yeterli olmaktadır (Davis 2005).

BMPR1B diğér adıyla Booroola (Fec B) geni, 6. kromozom üzerinde olup ovaryumdaki bone

morphogenetic protein 1B reseptörünü kodlamaktadır (Davis 2005). Booroola geni, 1980'li yıllarda Avustralya'da çoklu doğum genleri içinde ilk bulunan ve mutasyon tespit edilen gendir (Davis ve ark. 1982). Bu genin, 1790'lı yıllarda Hindistan'dan getirilen Garole veya Bengal koyunu olarak bilinen koyunla getirildiği, merinos sürülerinin fertilitésini artırmak için kullanıldığı ve böylece Booroola hattının oluşturulduğu bildirilmektedir (Davis ve ark. 1982). Avrupa koyun ırklarında olmadığı tespit edilen bu mutasyonun Çin'de kısa kuyruklu Han ve Hu, Hindistanda Kendrapada ve Endonezya'da Javanese koyunlarında varlığı tespit edilmiştir (Davis ve ark. 2002, Davis ve ark. 2006, Fogarty 2009). BMPR 1B mutasyonu ovülasyon oranı için eklemeli, bir doğumdaki kuzu sayısı için kısmi dominanttır. Heterozigotluk halinde ovülasyon oranı 1.3- 1.72 ve homozigot mutasyon varlığında ise 2.7-3.0 kadar yükselirken, bir doğumdaki kuzu sayısı heterozigotluk halinde 0.9-1.32, homozigotluk halinde ise 1.1-1.7 düzeyinde artmaktadır (Piper ve ark. 1982, Logue ve ark. 1990, Dodds ve ark. 1991).

BMP15 diğér adıyla GDF9B (FecX) geni, koyunlarda foliküler gelişim için gerekli olan ve ovaryum kökenli büyüme faktörü, bone morphogenetic protein 15'i kodlayan gendir (Hanrahan ve ark. 2004). Koyunlarda X kromozomunda bulunan FecX, 5.4 kb büyüklüğündedir ve bir intron ile iki eksondan oluşmaktadır. Bu gen 393 aminoasit içeren bir prepropeptid kodlamaktadır. Koyunlarda BMP15 folliküllerin preovülasyon safhasına gelişimlerini engellerken, follikülogenezin erken dönemlerinde folliküllerin gelişimini destekler. Bu nedenle BMP-15 ovülasyon sayısı ve kuzulama sayısının belirlenmesinde çok önemli bir rol üstlenir (Gürsel 2009). Bu gen X kromozomunda bulunduğu için erkekler bu genin sadece bir kopyasını taşıyabilirler ve bu kopyayı erkek yavrularına geçiremezken dişi yavrularına geçirebilmektedirler (Davis 2005). Homozigot taşıyıcı olan dişilerin kısır olduğu ilk olarak Romney ırkı koyunlarda bulunmuş ve Inverdale geni (FecX^I) olarak isimlendirilmiştir. Koyunlarda BMP15 folliküllerin preovülasyon safhasına gelişimlerini engellerken, follikülogenezin erken dönemlerinde folliküllerin gelişimini destekler. Bu nedenle BMP15 ovülasyon sayısı ve kuzulama sayısının belirlenmesinde çok önemli bir rol üstlenir (Gürsel 2009). Bu güne kadar yapılan çalışmalarda BMP15 geni için Romney koyunlarında FecX^I, FecX^H, Galway koyunlarında FecX^G, Belclare koyunlarında FecX^B, Lacaune koyunlarında FecX^L, Rasa Aragonesa koyunlarında FecX^R, Grivette koyunlarında FecX^{Gr} ve Olkaska koyunlarında FecX^O olmak üzere sekiz adet tek nükleotid polimorfizmi (Single nucleotide

polimorphism: SNP) tespit edilmiştir. (Davis 1982, Alink ve ark. 2005, Davis 2005, Bodin 2007, Gürsel 2009, Monteagudo ve ark. 2009, Demars ve ark. 2013, Drouilhet ve ark. 2013). BMP 15 geni yönünden, Romney koyunlarındaki FecX^L, FecX^H, Galway koyunlarındaki FecX^G, Belclare koyunlarındaki FecX^B, Lacaune koyunlarındaki FecX^L ve Rasa Aragonesa koyunlarındaki FecX^R mutasyonları heterozigot olarak taşındığında bunun ovülasyon oranını ve bir doğumdaki kuzu sayısını artırdığı, ancak homozigotluk durumunda infertilite problemlerine neden olduğu bildirilmiştir (Davis 2005, Gürsel 2009, Monteagudo ve ark. 2009, Demars ve ark. 2013, Drouilhet ve ark. 2013). Bununla beraber Grivette koyunlarındaki FecX^{Gr} ve Olkaska koyunlarındaki FecX^O mutasyonlarının diğerlerinin aksine homozigot hale geçmesi durumunda koyunların çoklu doğum oranında yükselmeye yol açtığı bildirilmiştir (Demars ve ark. 2013).

GDF9 geninin koyunlarda ovülasyon ve doğum oranlarına etkisinin olduğu ve koyunların 5. kromozomunda bulunan 2.5 kb büyüklüğünde bir adet intron ve iki adet eksondan oluştuğu, ayrıca 453 aminoasitten oluşan bir prepropeptidi kodladığı bildirilmektedir (Sadighi ve ark. 2002). GDF9 genindeki FecG^H mutasyonu C'nin T'ye değişmesi sonucu olgunlaşmış peptidin 77. pozisyonunda serinin yerine fenilalaninin geçmesine neden olmaktadır (Hanrahan ve ark. 2004). Gürsel (2009), GDF9 genindeki mutasyonun BMP15 mutasyonuna kıyasla ovülasyon oranı üzerine daha büyük etkisinin olduğunu bildirmiştir. Dahası bu araştırmacı ovülasyon oranının hem BMP15 hem de GDF9 mutasyonlarını birlikte heterozigot olarak taşıyanlarda, bu mutasyonların sadece birini heterozigot taşıyanlara göre daha fazla olduğunu ifade etmiştir.

Pırlaklarda daha önce çoklu doğum ve buna ilişkin genler üzerine yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Mevcut çalışma, bu yönüyle öncü niteliğinde olup çoklu doğum yönünden literatür bildirişleri doğrultusunda majör genler olarak bilinen BMP1B, BMP15 ve GDF9'daki olası polimorfizmlerin Pırlak koyunlarda varlığının araştırılmasını amaçlamıştır.

MATERYAL ve METOT

Hayvan Materyali

Araştırma, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) koordinatörlüğünde Halk Elinde Ülkesel Küçükbaş Hayvan Islahı projesi kapsamında Pırlaklarda yürütülen projeye paralel olarak Afyonkarahisar İli Damızlık Koyun-Keçi Yetiştiricileri Birliği damızlık yetiştirme ve test istasyonunda elit sürü olarak yetiştirilen en az iki

kez tek ve en az iki kez çoklu doğum yapmış 16 baş Pırlak koyun üzerinde 2016-2017 yılları arasında yürütülmüştür. Ayrıca mevcut çalışma için Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 08.11.2016 tarihli ve 49533702/160 sayılı karar ile etik kurul onayı alınmıştır.

Kan Örneklerinin Alınması ve DNA İzolasyonu

Genetik çalışmalarda kullanılmak üzere toplanan kan örnekleri hayvanlarda *V. jugularis*'den EDTA'lı vakumlu tüplere alınmıştır. Kan örnekleri soğuk zincir ile laboratuvara getirilmiş ve DNA izolasyonu aşamasına kadar cryo tüplere konup -20°C'de saklanmıştır. Kandan DNA izolasyonu spin kolon kullanılarak Boom ve ark. (1990)'nın yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. DNA örnekleri %0,6'lık agaroz jelde bütünlükleri açısından kontrol edilmiş, miktarı ve kalitesi spektrofotometre cihazları (Multiscan GO ve Qubit) kullanılarak ölçülmüştür. DNA örnekleri 20 ng/µl olacak şekilde ayarlanmış ve analize kadar -20°C'de saklanmıştır.

PCR ve DNA Dizileme Analizleri

PCR analizi için Tablo 1'de verilen ve FastPCR 6.0 paket programı ile hazırlanan primerler kullanılmıştır (Kalendar ve ark. 2009).

Toplam 25 µl olan PCR karışımında, 2 µl DNA (20 ng/µl), her bir primerden (10pmol) 0,7 µl, 10xPCR buffer 2.5 µl, dNTP karışımından 0.5 µl (10mM, Roche), Platinum Taq Polimeraz (Thermo) 0.125 µl ve ddH₂O dan 18.5 µl bulunmaktadır. Reaksiyonlar ABI Veriti PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR cihazı 94 °C'de 2 dk; 35 döngü 94 °C'de 40 sn, T_m (melting temperature) (Tablo 1) 30 sn ve 72°C'de 1 dk, son aşamada 72°C'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır. Daha sonra PCR ürünleri agaroz jelde görüntülenmiştir.

PCR ürünlerini görüntülemek amacıyla %2'lik agaroz jel hazırlanmış ve Vilber Lourmat BIO-VISION jel görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülenmiştir. PCR ürünleri daha sonra ExoSAP ile temizlenmiştir. PCR ürünlerinin temizlenmesi amacıyla PCR tüpü içerisine 5 µl PCR ürününün, 0,5 µl Exonuclease-I (Thermo, EN0582) ve 1,0 µl FastAP (Thermo, EF0652) eklenmiştir. Hazırlanan karışım PCR cihazına konularak 37 °C ' de 15 dakika, 85 °C ' de 15 dakika olacak şekilde ayarlanmıştır.

DNA dizileme analizi için BigDye Terminator v3.1'den 2 µl, 1x sequencing buffer'dan 11 µl, ileri veya geri primerden (1 pmol) 5 µl ve PCR ürününden 2 µl olmak üzere toplam 20 µl karışım hazırlanmış ve PCR cihazı 96°C' de 30 sn ön

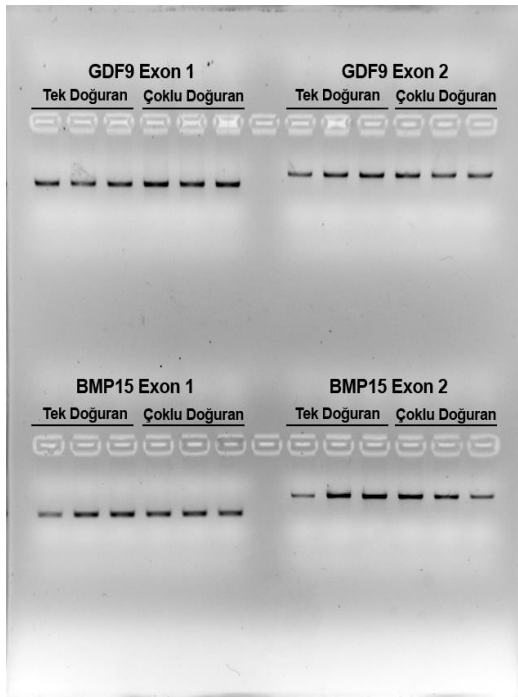
denatürasyon; ayrılma 96°C’ de 10 sn, yapışma 50°C’ de 15 sn ve uzatma 60°C’ de 4 dk 30 döngü olacak şekilde programlanmıştır. Daha sonra PCR ürünleri BigDye XTherminator ile temizlenmiş ve DNA dizileme cihazına (ABI 3500) yerleştirilmiştir. DNA dizileme analizi sonucu her bir örnek Sequencher 5.4.1 (Gene Code Corporation, Ann Arbor, Michigan, USA) analiz programı ile düzenlenmiş, *BioEdit* 7.0.9 Sequence Alignment (Hall 1999) programı yardımıyla hizalanmış ve polimorfizmler belirlenmiştir.

BULGULAR

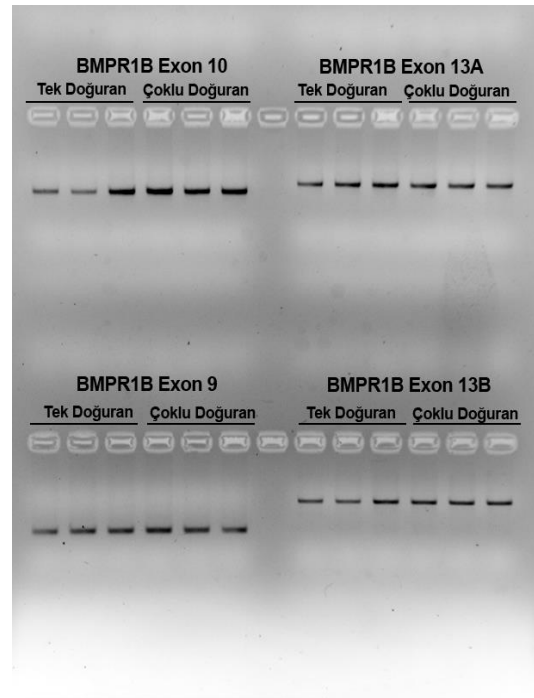
PCR analizi sonucunda BMPR1B geninin 9. eksonunda 419 bp, 10. eksonunda 696 bp ve 13. eksonunda 852 bp ile 957 bp büyüklüğünde, BMP15 geninin 1. eksonunda 462 bp ve 2. eksonunda 924 bp, GDF9 geninin 1. eksonunda 708 bp ve 2. eksonunda 1043 bp büyüklüğünde PCR ürünleri elde edilmiştir (Şekil 1-2, Tablo-1). Yapılan DNA dizileme analizi sonrası DNA dizileri düzenlenmiş ve hizalanarak polimorfizmler yönünden değerlendirme yapılmıştır. Analizler sonucunda tek ve çoklu doğum yapan Pırlıklarda BMPR1B, BMP15 ve GDF9 genlerinde polimorfizm saptanmamıştır.

Tablo 1. Çoklu doğumu etkileyen genler, büyüklükleri ve Tm dereceleri
Table 1. Sizes and Tm degrees of Genes affecting fecundity

Gen	İleri (Forward) primer	Geri (Revers) primer	T _m (°C)	Büyükük (bp)	
BMPR1B	Ekson 9	TGTGTCTGCTGTATTGGCACAC	GCTAGGAAACCCTGAACATCG	59	419
	Ekson 10	AGACACCTATGACAAAAGGACG	GCACACAATCCCAGACATTAGC	59	696
	Ekson 13a	GTATCGAGTGCCAGCCTTGCA	TCCACATCCTCTGAAGCTGC	63	852
	Ekson 13b	TCTGGGGATTCCCACCCATGAC	GCAAAGAAGAGGGGCTTCCCAA	59	957
BMP15	Ekson 1	ACATGTTGCTGAACACCAAGC	AGGCAATGTGAAGCCTGACA	63	462
	Ekson 2	CAGTTTGTACTGAGCAGGTC	GGCAATCATAACCCTCATACTCC	63	924
GDF9	Ekson 1	GAATTGAACCTAGCCCACCCAC	AGCCTACATCAACCCATGAGGC	63	708
	Ekson 2	AGGAACCTTTCCATCAGTGGA	TCTTCCCAAAGGCATAGACAGG	58	1043



Şekil 1. GDF9 ve BMP 15 genlerine ait PCR ürünlerinin jel görüntüsü
Figure 1. Gel electrophoresis of PCR products of GDF9 and BMP15 genes



Şekil 2. BMPR 1B genine ait PCR ürünlerinin jel görüntüsü
Figure 2. Gel electrophoresis of PCR products of BMPR1B gene

TARTIŞMA

Ovülasyon oranını artıran BMPR1B (booroola) geninin, Garole, Han, Hu, Kendrapada ve Javanese koyun ırklarında varlığı tespit edilmiştir (Davis ve ark. 2002, Davis ve ark. 2006, Fogarty 2009). BMPR 1B mutasyonu ovülasyon oranı için eklemeli, bir doğumdaki kuzu sayısı için kısmi dominanttır. Heterozigotluk halinde ovülasyon oranı 1.3-1.6 ve homozigot mutasyon varlığında ise 2.7-3.0'e yükselirken, bir doğumdaki kuzu sayısı heterozigotluk halinde 0.9-1.2, homozigot mutasyon halinde ise 1.1-1.7 düzeyinde artmaktadır (Piper ve ark. 1982, Dodds ve ark. 1991). Logue ve ark. (1990) tarafından yapılan bir çalışmada Texellerle Booroola Merinoslarının melezlenmesi sonucu meydana gelen Texel x Booroola Merinosu F₁ koyunlarının ovülasyon düzeyinin Texel ırkı koyunlara kıyasla 1.72 ve bir doğumda kuzu sayısının ise 1.32 kat yükseldiği tespit edilmiştir. Bu bulgulara göre BMPR1B geninin diğer ırklarda da döl verimi üzerine pozitif etkisi olduğu anlaşılmaktadır. Bu çalışmada Pırlak koyunlarda BMPR 1B geninde incelenen eksonlar bakımından polimorfizme rastlanmamıştır.

BMP15 geninde FecX^I ve FecX^H mutasyonlarına sahip heterozigot koyunlarda ovülasyon 1.0, çoklu doğum 0.6 düzeyinde yükselmekte iken homozigotluk durumunda infertilite problemleri çıktığı bildirilmiştir (Davis 1992, Alink ve ark. 2005, Davis 2005). Belclare allelinin bir kopyasını taşıyan heterozigot koyunlardaki ovülasyon oranı 1.0 düzeyinde yükselmekte olup diğer FecX mutasyonlarında olduğu gibi homozigot FecX^B koyunlarının steril olduğu belirtilmektedir (Davis 2005). Galway allelinin bir kopyasını taşıyan koyunların ovülasyon oranının 0.7 oranında yüksek olduğu tespit edilmiştir. FecX^I ve FecX^H mutasyonlarında olduğu gibi FecX^G mutasyonunu homozigot olarak taşıyan koyunlarda sterilite şekillenmektedir (Davis 2005, Gürsel 2009). Lacaune ırkında saptanan FecX^L mutasyonunu heterozigot olarak taşıyanların, taşımayanlara göre ortalama 1.5 adet daha fazla ovülasyona sahip olduğu bildirilmiştir. Bu mutasyonu homozigot olarak taşıyanlarda ise infertilite problemi olduğu saptanmıştır (Bodin 2007). İspanya koyun ırklarından olan Rasa Aragonesa koyunlarında bulunan FecX^R mutasyonunu taşıyan heterozigot koyunlarda çoklu doğum oranı 2.66'ya yükselirken taşımayan koyunlarda bu oranın 1.36 olduğu tespit edilmiştir. Mutasyonu homozigot olarak taşıyanlarda infertilite problemi yaşandığı bildirilmiştir (Monteagudo ve ark. 2009). Demars ve ark. (2013) Fransa'nın Grivette ve Polonya'nın Olkaska koyun ırklarındaki BMP15 geninde FecX^{Gr} ve FecX^O mutasyonları bulunduğunu ve diğer mutasyonların aksine homozigot mutasyona sahip

koyunların çoklu doğum oranında yükselme olduğunu bildirmişlerdir. Ancak bu çalışmada BMP 15 geni bakımından Pırlakların bir varyasyon göstermedikleri ve monomorfik oldukları tespit edilmiştir.

Koyunlarda yapılan ölçümlere dayanılarak GDF9 mutasyonunun BMP15 mutasyonuna kıyasla ovülasyon oranı üzerine daha büyük etkisi olduğu ve Cambridge ile Belclare ırklarında bir adet FecG^H taşıyanların ovülasyon oranlarının ortalama 1.4 civarında arttığı bildirilmiştir (Gürsel 2009). İlginç bir şekilde hem BMP15 hem de GDF9 mutasyonlarını heterozigot taşıyanlar, bu mutasyonları ayrı ayrı taşıyan heterozigot taşıyıcılardan daha yüksek ovülasyon miktarına sahip olmaktadır (Gürsel 2009). Bu çalışmada GDF9 geni yönünden pırlaklarda herhangi bir polimorfizme rastlanmamıştır.

SONUÇ

Araştırmada, çoklu doğumu belirleyen BMPR1B, BMP15 ve GDF9 isimli üç farklı gen ele alınmış ve her üç gen yönünden de Pırlak koyunların monomorfik yapıda oldukları tespit edilmiştir. Bu bilgiler ışığında, Pırlaklarda çoklu doğumu belirleyen bu genler yönünden daha kapsamlı araştırmalar yapılması ve çoklu doğumu etkileyen diğer genler yönünden de ırkın incelenmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Alink F M, Mylne MJA, Watt RG, Kenyon P, Wood MJ, McEvoy TG.** Inverdale fecundity gene (FecXI) influences twin ovulation incidence in pubertal ewe lambs from Texel sires and Cheviot or Scottish 2005; <http://www.bsas.org.uk/wp-content/themes/bsas/proceedings/Pdf2005/055.pdf>Blackface dams, 15.01.2016.
- Bodin L, Di Pasquale E, Fabre S, Bontoux M, Monget P, Persani L, Mulsant P.** A Novel Mutation in the Bone Morphogenetic Protein 15 Gene Causing Defective Protein Secretion Is Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Lacaune Sheep. *Endocrinology*, 2007; vol. 148(1), ss. 393–400.
- Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim Van Dillen PME, Van der Noordaa J.** Rapid and simple method for purification on nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 1990; ss.495-503.
- Çelikeloğlu K.** Pırlak Kuzularında Büyüme Eğrilerini Etkileyen Genetik ve Çevresel faktörlerin belirlenmesi ve eğri parametreleri

yönünden baba koçların değerlendirilmesi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Afyonkarahisar, 2012.

- Davis GH, Montgomery GW, Allison AJ, Kelly RW, Bray AR.** Segregation of a major gene influencing fecundity in progeny of Booroola sheep. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 1982; vol. 25, ss. 525–529.
- Davis GH, Galloway SM, Ross IK, Gregan SM, Ward J, Nimbkar BV, Ghalsasi PM, Nimbkar B, Gray GD, Subandriyo I, Tiesnamurti B, Martyniuk E, Eythorsdottir E, Mulsant P, Lecerf F, Hanrahan JP, Bradford GE, Wilson T.** DNA tests in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola (FecB) mutation. *Biology of Reproduction*, 2002; vol. 66, ss. 1869–1874.
- Davis GH.** Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genetics Selection Evolution*, 2005; vol. 37, ss.11–23.
- Davis GH, Balakrishnan L, Ross IK, Wilson T, Galloway SM, Lumsden BM, Hanrahan JP, Mullen M, Mao XZ, Wang GL, Zhao ZS, Zeng YQ, Robinson JJ, Mavrogenis AP, Papachristoforou C, Peter C, Baumung R, Cardyn P, Boujenane I, Cockett NE, Eythorsdottir E, Arranz JJ, Notter D.** Investigation of the Booroola (FecB) and Inverdale (FecXI) mutations in 21 prolific breeds and strains of sheep sampled in 13 countries. *Animal Reproduction Science*, 2006; vol. 92, ss. 87–96.
- Demars J, Fabre S, Sarry J, Rossetti R, Gilbert H, Persani L, ... & Martyniuk E.** Genome-wide association studies identify two novel BMP15 mutations responsible for an atypical hyperprolificacy phenotype in sheep. *PLoS genetics*, 2013; 9(4), e1003482.
- Dodds KG, Davis GH, Elsen JM, Isaacs KL, Owens JL.** The effect of Booroola genotype on some reproductive traits in a Booroola Merino flock. In Elsen J.M., Bodin L., Thimonier J. (Ed), “Major genes for reproduction in sheep”. INRA, Paris: 1991; 359-366.
- Drouilhet L, Mansanet C, Sarry J, Tabet K, Bardou P, Woloszyn F, Lluch J, Harichaux G, Viguie' C, Monniaux D, Bodin L, Mulsant P, Fabre S.** The Highly Prolific Phenotype of Lacaune Sheep Is Associated with an Ectopic Expression of the B4GALNT2 Gene within the Ovary. *PLoS Genetics*, 2013; vol. 9(9): e1003809.
- Fogarty NM.** A review of the effects of the Booroola gene (FecB) on sheep production. *Small Ruminant Research*, 2009; vol. 85, ss. 75-84.
- Gürsel FE.** Mutations in BMPR-1B, BMP-15 and GDF-9 genes and their effects on fecundity and ovulation rate in sheep. *Veteriner Fakültesi Dergisi (İstanbul)*, 2009; Vol 35(2), ss. 57-66
- Hall TA.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 1999; 41, ss. 95-98.
- Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, Galloway SM.** Mutations in the Genes for Oocyte-Derived Growth Factors GDF9 and BMP15 Are Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Cambridge and Belclare Sheep (*Ovis aries*). *Biology of reproduction*, 2004; vol. 70, ss. 900–909.
- 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.
- Karşlı T, Şahin E, Karşlı BA, Alkan S, Balcioğlu, MS.** An investigation of mutations (FecXG, FecXI, FecXH, FecXB) on BMP-15 gene in some local sheep breeds raised in Turkey. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2012; 25(1): 29-3.
- Kumm KI.** Profitable Swedish lamb production by economic scale. *Small Ruminant Research*, 2008; vol. 81, ss. 63–69.
- Logue DN, Gill A, MacAuslan J, Waterhouse A, Boyd JS, Harvey MJA.** The incorporation of the 'Booroola gene' into the Texel breed of sheep. *Animal Breeding Abstracts*, 1990; 60-3033.
- Monteagudo LV, Ponz R, Tejedor MT, Lavina A, Sierra I.** A 17 bç deletion in the Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) gene is associated to increased prolificacy in the Rasa Aragonesa sheep breed. *Animal Reproduction Science*, 2009; vol. 110, ss. 139–146.
- Notter DR.** Genetic Aspects of Reproduction in Sheep. *Reproduction in Domesticated Animals*, 2008; vol. 43, ss. 122-128.
- Piper LR, Bindon BM, Nethery RD.** The Booroola Merino and the performance of medium non-peppin crosses at Armidale. *The Booroola Merino, Proceedings of a*

Workshop, Armidale, CSIRO, 1982. ss. 9–19.

Pramod KR, Sharma SK, Kumar R, Rajan A. Genetics of ovulation rate in farm animals. *Veterinary World*, 2013; vol. 6(11), ss. 833-838.

Sadighi M, Bodensteiner KJ, Beattie AE, Galloway SM. Genetic mapping of ovine growth differentiation factor 9 (GDF9) to sheep chromosome 5. *Anim. Genet.*, 2002; 33 (3): 244-245.

Tekerli M, Erdoğan M, Koçak S, Çelikeloğlu K, Bozkurt Z, Hacan Ö. Halk Elinde Küçükbaş Hayvan Islahı Ülkesel Projesi, Pırlak koyunlarının halk elinde ıslahı projesi kesin raporu, T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, 2016.

Tosh CC, Kemp RA. Estimates of variance components for lamb weights in three sheep populations. *Journal of Animal Science*. 1994; 72: 1184-1190.

Üniversite Kampüs Kantinlerindeki Gıdaların Mikrobiyolojik Kalitesinin ve Gıda Çalışanlarının El Hijyen Durumlarının Değerlendirilmesi[#]

Şebnem PAMUK^{1*}, Metin ERDOĞAN², Yeliz YILDIRIM³, Harun HIZLIŞOY⁴, Serhat AL⁵, Özgür SEPİN⁶

¹Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, TÜRKİYE

²Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veteriner Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, TÜRKİYE

³Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Kayseri, TÜRKİYE

⁴Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Kayseri, TÜRKİYE

⁵Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Kayseri, TÜRKİYE

⁶Sepin veteriner Kliniği, Ankara Yolu, Afyonkarahisar, TÜRKİYE

[#]Çalışma, AKÜ BAP Koordinasyon Birimi tarafından 16VF 13 nolu proje ile desteklenmiş ve 7. Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur.

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

ÖZ

Bu çalışmada, Afyon Kocatepe Üniversitesi Ahmet Necdet Sezer Kampüsü'nde gıda satışı yapan 6 adet kantinden yaz ve kış aylarında olmak üzere 2'şer kez örnekler alındı. Çalışma kapsamında çalışanların parmaklarından, dilimleme tahtalarından, bıçak saplarından ve değişik gıdalardan örnekler alınarak Aerob Mezofil Bakteri, *S. aureus*, *Enterobacteriaceae*, total koliform, *Escherichia coli*, sülfid indirgeyen anaerob bakteriler, *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella* spp., açısından analiz edildi. İncelenen 100 adet gıda örneğinin %91'inde toplam Aerob Mezofil Bakteri (AMB) $\geq 10^3$ kob/g, %21'inde *Enterobacteriaceae*, %64'ünde koliform bakteri, %14'ünde *E. coli*, %25'inde *S. aureus* $\geq 10^2$ kob/g düzeylerinde bulundu. Gıda örneklerinin (tavuk şiş) 1'inden *Salmonella* spp., %3'ünden *L. ivanovii*, %5'inden *L. seeligeri*, %4'ünden *L. welshimeri* identifiye edilirken, sülfid indirgeyen anaerob bakteri ve *L. monocytogenes* saptanmadı. Bıçak örneklerinin %77.5'inde AMB $\geq 10^3$ kob/g, %35'inde *Enterobacteriaceae*, %52.5'sinde koliform, %12.5'inde *E. coli*, %17.5'inde *S. aureus*, $\geq 10^2$ kob/g düzeylerinde identifiye edildi. Yüzey örneklerinin ise; %55'inde AMB $\geq 10^3$ kob/g, %29.6'sında *Enterobacteriaceae*, %37'sinde koliform bakteri, %11'inde *E. coli*, %14.8'inde *S. aureus* $\geq 10^2$ kob/g düzeylerinde tespit edildi. Gıda çalışanlarının el örneklerinin mikroorganizma kontaminasyon düzeyleri sırasıyla; örneklerin %6.6'sında *Enterobacteriaceae* ≥ 2.5 kob/cm², %8.8'inde ≥ 1.0 kob/cm²; % 4.4'ünde koliform bakteri ≥ 2.5 kob/cm² ve % 15.5'inde ≥ 1.0 kob/cm²; %14.7'sinde *E. coli* ≥ 1.0 kob/cm²; %15.5'inde *S. aureus* ≥ 2.5 kob/cm² ve %15.5'inde ≥ 1.0 kob/cm² olarak belirlendi. El örneklerinden saptanan bu değerlerin literatürde belirlenen hedef değerlerin (<2.5 kob/cm²) üzerinde olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Üniversite kampüsü, Gıda çalışanı, Gıda güvenliği bilgisi, İndikatör mikroorganizma, Kantinler

Evaluation of Hand Hygiene Situation of Food Handlers and Microbiological Quality of Retailed Some Foods in University Campus Canteen

ABSTRACT

In this study, samples sailed six canteens were taken 2 times including the summer and winter in the Afyon Kocatepe University Ahmet Necdet Sezer Campus. Scope of work the fingers of workers, slicing boards, from the knife handle and various food samples were analyzed for mesophilic aerobic bacteria, *S. aureus*, *Enterobacteriaceae*, total coliform, *E. coli*, sulphite-reducing anaerobe bacteria *L. monocytogenes* and *Salmonella*. Contamination levels of 100 food samples were detected respectively; 91% of samples $\geq 10^3$ cfu/g TMAB, %21 *Enterobacteriaceae* $\geq 10^2$ cfu/g, 64% coliforms $\geq 10^2$ cfu/g, 14% *E. coli* $\geq 10^2$ cfu/g and 25% *S. aureus* $\geq 10^2$ cfu/g. *Salmonella* spp. was detected only one samples (chicken skewer). While 3% *L. ivanovii*, 5% *L. seeligeri*, 4% *L. welshimeri* were isolated from all of the food samples, sulphite-reducing anaerobe bacteria and *L. monocytogenes* was not detected. The levels of microorganisms were found from the knife samples respectively; TMAB $\geq 10^3$ cfu/g (77.5%); *Enterobacteriaceae* $\geq 10^2$ cfu/g (35%); coliforms $\geq 10^2$ cfu/g (52.5%); *E. coli* $\geq 10^2$ cfu/g (12.5%); *S. aureus* $\geq 10^2$ cfu/g (17.5%). Surface samples were found contaminated with TMAB $\geq 10^3$ cfu/g (55%); *Enterobacteriaceae* $\geq 10^2$ cfu/g (9.6%); coliforms $\geq 10^2$ cfu/g (37%); *E. coli* $\geq 10^2$ cfu/g (11%); *S. aureus* $\geq 10^2$ cfu/g (14.8%). None of the samples were not detected sulphite-reducing anaerobe bacteria, *L. monocytogenes* and *Salmonella*. Contamination levels of hand samples were detected respectively; *Enterobacteriaceae* ≥ 2.5 kob/cm² (6.6%) and ≥ 1.0 kob/cm² (8.8%) of samples; coliforms ≥ 2.5 kob/cm² (4.4%) and ≥ 1.0 kob/cm² (15.5%); *E. coli* ≥ 1.0 kob/cm² (14.7%); *S. aureus* ≥ 2.5 kob/cm² and ≥ 1.0 kob/cm² (15.5%). It was concluded that these values determined from the hand samples were concluded above the target values (<2.5 cfu / cm²) in the literature.

Keywords: University campus, Food handlers, Knowledge food safety, Indicator microorganism, Canteens

To cite this article: Pamuk Ş, Erdoğan M, Yıldırım Y, Hızlısoy H, Al S, Sepin Ö. Üniversite Kampüsü Kantinlerindeki Gıdaların Mikrobiyolojik Kalitesinin ve Gıda Çalışanlarının El Hijyen Durumlarının Değerlendirilmesi. Kocatepe Vet J. (2018) 11(4): 363-373.

GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre, her yıl 600 milyon insan kontamine gıda tüketimi sonucu hastalanmaktadır. Bunların 420.000'inin öldüğü, ölenlerin 125.000'inin ise 5 yaşın altındaki çocuklardan oluştuğu rapor edilmiştir (WHO, 2015) Gıda güvenliği, sürdürülebilir gelişmişliğin önemli bir bileşenidir. Çünkü, globalleşen gıda üretim süreci, gıda güvenliği üzerinde önemli bir etki oluşturmuştur. Bu işleyiş, geniş popülasyonların gereksinimlerini araştırma ve karşılama amacıyla üretim, dağıtım ve pazarlamaya odaklanmıştır. Ancak, global gıda bilgisine rağmen, biyolojik, kimyasal, fiziksel tehlikelerin varlığı satışa sunum hatalarına yol açmaktadır (WHO, 2013).

Okul yaşına giren çocuklar ve ergenler için güvenli gıda sağlanması, hükümetler ve diğer ilgili taraflar için büyük bir endişe kaynağı olup, söz konusu grubun sağlık, büyüme ve gelişmesini iyileştirmekte aynı zamanda gelişmekte olan ülkelerde eğitimin devam etmesini teşvik etmektedir (Afoakwa, 2005; Oranusi ve ark., 2007; Santana ve ark., 2009). Bu nedenle, kontaminasyonların neden olduğu gıda kaynaklı hastalıklar, catering sektöründe önem teşkil etmektedir. Bu tip gıda kaynaklı hastalık ve salgınlar, dünya genelinde gözlenen mortalite ve morbiditeye büyük katkı sağlamaktadır (McIntyre ve ark., 2013). Kore'de gıda kaynaklı hastalık vaka bildirimlerinin %47'sinin, Brezilya'da %11.6'sının okul catering servislerine ait olduğu bildirilmektedir. (Santana ve ark, 2009; Ryu ve ark., 2011). Güney Wales'te 2005 yılında okul yemeğinden *E. coli* O157:H7 vakası (Meldrum ve ark., 2009), Fransa'da 2010 yılında 544 yetişkinin etkilendiği *Salmonella* spp., kaynaklı gıda zehirlenmesi, 2012 yılında Almanya'da yüzden fazla okulda 11.200 öğrencinin etkilendiği norovirus salgını (Marzono ve Balzaretta, 2013), Gana'nın Accra Rejijonal bölgesi'ndeki bir okulda 2007 yılında 1348 okul çocuğunu etkileyen gıda zehirlenme vakası (WHO, 2009; WHO, 2012) bildirilmiştir. Malm ve ark., (2015) söz konusu durumların, gıdaların muhafaza koşullarındaki yetersizlikten ve aynı zamanda okullarda zehirlenme vakalarının tekrar oluşmasından kaçınmak için oluşturulmuş bir protokolün olmamasından kaynaklandığını bildirmiştir.

Gıda çalışanlarının tüm gıda kaynaklı salgınların %97'sinden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir (Egan ve ark., 2007). Bu nedenle, gıda çalışanlarının güvenli ve hijyenik gıda sağlamaya ilişkin sorumlulukları kritik öneme sahiptir (Greig ve ark., 2007). Gastro-intestinal hastalığa yakalanan gıda çalışanlarının elleri vasıtasıyla zararlı mikroorganizmalar yayılmakta ve çapraz kontaminasyonlara yol açmaktadır (Abdul-Mutalib

ve ark., 2012). Avrupa Birliği'nde, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA, 2010) tarafından 2008 yılında, toplam 5332 gıda zehirlenmesi vakasından 45.622 kişinin etkilendiği, 6230 kişinin hastanede tedavi altına alındığı, 32 kişinin ise öldüğü bildirilmiştir. Bu rapora göre; gıda hazırlanması esnasında personel kaynaklı bulaşmalar, uygun olmayan gıda muhafaza yöntemleri, kontamine işlenmemiş katkı maddesi kullanımı, uygun olmayan ısı-zaman parametreleri ve yetersiz ısı işleminin başlıca sebepler olduğu rapor edilmiştir. Avrupa Birliği 852/ 2004 no'lu regülasyonuna göre, gıda hijyeni konusunda gıda çalışanlarının eğitilmeleri yasal bir gereklilik olup, gıda ile teması olan personelin kendi iş alanlarına göre gıda hijyeni konusunda eğitilmeleri ve denetlenmeleri teminat altına alınmıştır. Yapılan düzenlemelere rağmen, son zamanlarda İngiltere, İrlanda, Portekiz, Slovenya ve Türkiye'de yapılan çalışmalar gıda çalışanlarının hijyen bilgi ve uygulamalarının iyileştirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır (Baş ve ark., 2006; Bolton ve ark., 2008; Gomes-Neves ve ark., 2007; Jevsnik ve ark., 2008; Tokuç ve ark, 2009; Walker ve ark., 2003). Gıda çalışanları yoluyla meydana gelen gıda zehirlenmelerinde üç temel faktör rol almaktadır: 1) çalışanların konuya ilişkin bilgisi 2) tutumu ve 3) davranışlarıdır (Sharif ve Al-Malki, 2010). Hizmet içi eğitim programları, çalışanların bilgisini artırmak için önemli olmakla birlikte, çok fazla bilgi vermek her zaman çalışanların tutum ve davranışlarında pozitif yönde bir değişikliğe neden olmayabilmektedir (Ansari-Lari ve ark, 2010). Bu nedenle birçok ülkede gıda çalışanların bilgi, genel durum ve gıda hazırlama uygulamalarıyla ilgili birçok çalışma yapılmıştır (Ansari-Lari ve ark, 2010; Bas ve ark, 2006; Capunzo ve ark, 2005; Jevsnik ve ark, 2008; Martins ve ark., 2012; Seaman ve Eves, 2010). Tüm bu çalışmalarda, öncelikle hizmet içi eğitim gereklilikleri belirlenmiş, eğitim sonrası verilen eğitimin etkinliği değerlendirilmiş ve iyi kalitede gıda üretiminin sürekliliğini sağlamak için söz konusu eğitimlerin süreklilik arz etmesi gerektiği vurgulanmıştır.

Kantin ortamlarında öğrencilerin tüketimine sunulacak gıdaların hazırlanmasında görevli gıda çalışanlarının iyi kaliteli gıda hazırlayabilmeleri için ilgili mevzuata uygun çalışma prensiplerini benimsemiş olmaları gerekmektedir. İlgili mevzuatlara rağmen, gıda hazırlama esnasında alınan güvenlik önlemlerinin yeterli olmadığı, çoğu yerde gıda hazırlamanın belli aşamalarında spesifik sanitasyon gerekliliklerinin göz ardı edildiği, uygulanmadığı gözlemlenmektedir. Gıda güvenliği kapsamında iyi personel hijyeni ve sanitasyon uygulamaları, gıda kaynaklı hastalıkların önlenmesinde temel basamak olarak görülmektedir. Çoğu gıda personelinin konuya ilişkin yeterli bilgi

ve beceriye sahip olmasına karşın, halen birçok gıda zehirlenme vakalarından gıda personelinden kaynaklanan kontaminasyonlar sorumlu tutulmaktadır (Ehiri ve Morris, 1996; Greig ve ark, 2007; Howes ve ark, 1996).

Patojenlerin muhtemel varlığına işaret eden mikroorganizmaları veya mikroorganizma grubunu tanımlayan mikrobiyel indikatörlerin varlığı ve sayısı genel olarak sanitasyon programlarının etkinliğinin değerlendirilmesi için kullanılmaktadır (Moore ve Griffith, 2002). Hijyen uygulamaları ile ilişkili olarak, indikatör mikroorganizmalar, total canlı bakteri sayısı, koliformlar, *E.coli*, *Enterobacteriaceae* ve *S. aureus* olarak tanımlanmıştır (Department of Health, South Africa, 2001). En yaygın gıda kaynaklı hastalık, stafilkokkal gıda zehirlenmesi olmakla birlikte, diğer enfeksiyon etkenleri arasında *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Bacillus* ve *Clostridium* türleri yer almakta ve söz konusu etkenlerin sebep olduğu enfeksiyonlar ölümlere ve önemli ölçüde iş gücü kayıplarına yol açmaktadır (Talaro ve Talaro, 1996; Borch ve Arinder, 2002). İnsan kafa derisinde yaklaşık 10^6 kob/cm², koltuk altında 5×10^5 kob/cm², karın bölgesinde 4×10^4 kob/cm², ön kol bölgesinde 1×10^4 kob/cm², ellerinde 3.9×10^4 ile 4.6×10^6 kob/cm² arasında parmak ucunda ise 0 ile 300 kob/cm² civarında bakteri bulunduğu rapor edilmiştir (WHO, 2009). Bu bakteriler arasında stafilkokklar ellerde bulunmalarına karşın, ana rezervuarı insan burun delikleridir. Bu mikroorganizma, subkutan ve deri enfeksiyonları, osteomyelit, pneumoni, apse, endokardit ve bakteriyemi gibi çok geniş bir enfeksiyon grubundan sorumludur (Gelatti ve ark., 2009). *S. aureus* giysi ve kuru yüzeyler gibi ortamları ve stresli çevre şartlarını tolere edebilen bir bakteridir (Chaibenjawong ve Foster, 2011). Bu sebeple ellerde ve yüzeylerde ilk kontakten sonra uzun süreler canlı kalabilir (Kusumaningrum ve ark., 2002; Scott and BloomWield, 1990). *E. coli* bağırsak kökenli patojen bir mikroorganizma olup, genel olarak tuvalet hijyeni yetersizliğinden kaynaklanmakta ve yine gıda ile temas halinde olan personelin eli ile gıdaya bulaşmaktadır (Lues ve Tonder, 2007). Tüketime hazır gıdaların, ısı uygulaması ya da pişirme sonrası dilimleme ve paketlenme aşamalarında *S. aureus* ile kontamine oldukları, çevresel yüzeylerdeki *S. aureus* sayısında da artış belirlendiği, bu durumun çapraz kontaminasyonlar sonucu şekillendiği bildirilmiştir. Etken sıklıkla gıda çalışanlarının eldivenlerinde bulunmaktadır (Syne ve ark., 2013). Eldivenler, hazır gıda satışı yapılan yerlerde çalışanlar tarafından sıklıkla değiştirilmezse, çapraz kontaminasyonun en önemli kaynağını oluşturmaktadır. Çünkü patojen bakteriler, eldiven yüzeyine yapışır. Eller doğru bir şekilde yıkanmadan eldivenlerin giyilmesi ile eldivenin

içinin ve dışının kontamine edildiği, eldiven giyildiğinde, genellikle el yıkama işleminden kaçınıldığı belirtilmektedir. Bu durumda eldiven; ılık, nemli bir ortam sağlamakta ve ellerdeki mikrobiyel gelişimi hızlandıran ve teşvik eden bir ortam oluşturmaktadır (Lues ve Van Tonder, 2007; Aycicek ve ark., 2004). Bu nedenledir ki, el hijyeni, patojen mikroorganizmaların geçişinin önlenmesinde, enfeksiyon görülme sıklığının azalmasında oldukça önemli bir uygulamadır (Soares ve ark., 2012; Schweon ve ark., 2013). Su ve sabun ile yıkamayla, kontamine elden uzaklaştırılan bakteri oranının (ortalama log₁₀ azalma) 15 s'de 0.6-1.1; 30 s'de 1.8-2.8; 1 dk'da 2.7-3.0; 2 dk'da 3.3; 4 dk'da 3.7 düzeyinde azaldığı tespit edilmiştir (Rotter, 1999). Bu çalışmada Afyon Kocatepe Üniversitesi Ahmet Necdet Sezer Kampüsü'ndeki kantin ve kafeteryalarda farklı türde tüketime sunulan hazır gıdalardan, dilimleme tahtalarından, bıçak saplarından alınan örnekler, AMB, total koliform, *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, sülfid indirgeyen anerob bakteriler, *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella* spp. açısından analiz edildi. Çalışan personelin elleri ise, koliform, *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* bakımından incelendi. Ayrıca çalışma kapsamında, gıda satışı yapılan işletmelerde gıdaların mikrobiyel kalitesine etki edebilecek faktörleri (işletme, personel ve hijyen bilgileri) değerlendirmek amacıyla anket uygulaması yapıldı. Çalışma sonunda, anket sonuçları ile incelenen mikrobiyolojik parametreler arasında ilişki olup olmadığı değerlendirildi.

MATERYAL ve METOT

Çalışmada kampüs içerisindeki 6 farklı kantine ait örnekler, yaz ve kış dönemlerini kapsayacak şekilde incelendi. Yazın Haziran-Temmuz-Agustos, kışın Aralık-Ocak-Şubat aylarında, toplam 100 adet gıda örneği, 45 personelin el örneği, 27 adet kesim tahtası ve 40 adet bıçak sapı yüzey örneği toplandı. El örnekleri *Enterobacteriaceae*, koliform, *E. coli* ve *S. aureus* yönünden; gıda, bıçak ve yüzey örnekleri ise; AMB, *Enterobacteriaceae*, total koliform, *E. coli*, *S. aureus*, sülfid-indirgeyen anaerob bakteri, *L. monocytogenes* ve *Salmonella* spp. bakımından incelendi.

Ellerin Örnekleme

Satış yerlerinde çalışan personelin her iki eline ait, başparmak ve işaret parmağını örnekleme için selektif agar içeren RODAC petripleri kullanıldı. Bu amaçla işaret parmağı için *S. aureus* izolasyonunda Baird-Parker Agar'a (Oxoid CM 0275) alınan örnekler 24-48 saat 37°C'de inkube edildi. Etrafı beyaz haleli siyah koloniler tipik *S. aureus* kolonileri olarak değerlendirilerek, koagulaz test (Oxoid, Staphylect test kit) ile doğrulandı. Çalışanların

başparmaklarında *Enterobacteriaceae*, total koliform, *E. coli* türlerini tespit etmek amacıyla Chromocult coliform Agar (Merck, 1.10426) kullanıldı. Petriler 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda tipik somon-kırmızı renk koloniler koliform grubu bakteri, koyu mavi-mor menekşe renginde olanlar *E. coli* ve renksiz koloniler ise *Enterobacteriaceae* familyasına ait olarak değerlendirildi (Blood ve Curtis 1995; De Boer 1998).

Yüzeylerin Örnekleme

Kesim tahtaları ve bıçak saplarını örnekleme için iç alanı 15 cm² olan steril bir çerçevenin sınırladığı bölgeden 2 farklı swap örneği alındı. Swap örneklerinden biri AMGC, total koliform *E. coli*, *Enterobacteriaceae*, *S. aureus* ve sülfid-indirgeyen anaerob bakterilerin sayımı için kullanıldı. Diğerleri *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. izolasyonunun ilk adımı olan ön zenginleştirme aşaması için kullanıldı. Bu amaçla AMGC, total koliform *E. coli*, *Enterobacteriaceae*, *S. aureus* ve sülfid-indirgeyen anaerob bakterilerin sayımı için kullanılacak steril pamuklu swaplar (T56-A, Technical Service Consultants Ltd.) %0.05 Sodyum tiyosülfat içeren maksimum geri kazanım sulandırma (MRD, maximum recovery diluent OXOID CM733) ajanı ile ıslatıldıktan sonra bıçak ve kesim tahtaları yüzeylerine 3'er defa 3 yönde sürülerek örnekleme işlemi tamamlandı. Swaplar tekrar MRD tüplerine yerleştirildi (Redmond ve ark., 2004; Cordoba ve ark., 1999). Söz konusu tüpler soğuk zincir altında laboratuvara taşınarak steril peptonlu su ile seri dilüsyonları hazırlanarak her bakteriye özel besi yerleri kullanılmak suretiyle ekimler yapıldı. Yüzey ve bıçak saplarından alınan swap örneklerini içeren tüpler, sayımı yapılacak diğer bakteriler için ilgili besi yerlerine ekim yapıldıktan sonra sülfid indirgeyen anaerob bakterilerin spor formlarının sayımı için 75°C'de 20 dakika ısı işlemine tabi tutuldu. Isı işleminden sonra 1 ml alınıp steril petrilere 1'er ml inoküle edilerek üzerine 15 ml Iron Sulfite Agar (Oxoid, CM 0079) dökülüp, soğutulmuş yaklaşık 5-10 ml aynı agardan ikinci kat döküm yapılarak anaerob koşullarda 24-48 saat 37±1 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda siyah koloniler değerlendirmeye alındı (ISO, 2003). Kesim tahtaları ve bıçak saplarından alınan ikinci swaplar ise içerisinde 10 ml half fraser broth bulunan steril tüplere alınarak direkt olarak ön zenginleştirme aşaması için kullanıldı. Swap örneklerinden *L. monocytogenes* izolasyonu için (ISO11290-1) prosedürü kullanıldı (ISO, 2004). *Salmonella* izolasyonu için ise, ISO 6579 (ISO, 2002) yöntemi uygulandı.

Gıdaların Örnekleme

İşletmelerden ayrıca steril poşetlere 100'er g gıda örnekleri alınarak diğer örnekler ile birlikte soğuk zincir altında laboratuvara getirilerek 1-2 saat

içerisinde analize alındı. Alınan gıda örneklerinden 10'ar g tartılarak, AMGC için Plate Count Agar (PCA)'a ekim yapılarak 30°C'de 48-72 saat inkübe edildi. *S. aureus* için Baird Parker Agar'a ekim yapılarak 35°C'de 24-48 saat inkübasyonun ardından tipik *S. aureus* kolonileri (etrafı beyaz hale ile çevrili siyah koloniler) sayılarak değerlendirmeye alındı (Baird ve Lee, 1995). Elde edilen koloniler koagülaz test kiti kullanılarak doğrulandı (Staphytest test kit OXOID). Total koliform *E. coli* ve *Enterobacteriaceae* familyasına ait bakteri türlerini tespit etmek amacıyla Chromocult Coliform Agar (Merck, 1.10426) kullanılarak, 35-37°C'de 24 saat inkübasyon sonucunda tipik somon-kırmızı renk koloniler koliform grubu bakteri, koyu mavi-mor menekşe renginde olan koloniler *E. coli* ve renksiz koloniler ise *Enterobacteriaceae* familyasına ait olarak değerlendirildi (Blood and Curtis, 1995; De Boer, 1998). Sülfid-indirgeyen anaerob bakterilerin sayımı için Iron Sulfite Agar'a (Oxoid, CM 0079) ekim yapılarak, 37°C'de 48 saat inkübasyonun ardından siyah koloniler değerlendirmeye alındı (ISO, 2003). *L. monocytogenes* izolasyonu ISO 11290-1 prosedürüne göre yapıldı (ISO, 2004). Bu prosedüre göre; her bir örnekten 25 g alınarak steril stomacher poşetine konulduktan sonra üzerine 225 ml Half Fraser Broth (Oxoid, CM0895) eklenip homojenize edilerek 30°C'de 24 saat inkübe edildi. Daha sonra zenginleştirilme brothlarından 0.1 ml alınarak içerisinde 10 ml Fraser Broth bulunan tüplere aktarıldıktan sonra 48 saat 37°C'de selektif zenginleştirme aşaması gerçekleştirildi. Fraser brothlarda selektif zenginleştirme sıvısından bir öze dolusu alınıp Chromogenic Listeria Agar'a (Oxoid, CM1084) ve Listeria selektif agar'a (Oxford) (Oxoid, CM856) ekim yapıldı. Söz konusu selektif agarlar 37°C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda Oxford agar'da etrafı siyah hale ile çevrili yeşilimsi röfle veren koloniler, chromogenic *Listeria* agar'da ise etrafı opak haleli yeşil-mavi koloniler şüpheli kabul edildi. Her bir besi yerinde 5 şüpheli koloni %0.6'lık Yeast Extract Powder (TSYEA) (Oxoid LP0021) ilaveli Tryptic Soy Agar'a (Oxoid CM0131) geçilerek 24 saat 37°C'de inkübe edildi. Elde edilen izolatlar gram boyama hareketlilik testi, katalaz, oksidaz, hemoliz CAMP testleri ve karbonhidrat kullanımı açısından test edilip aynı zamanda *Listeria* 12L Microbact sistemi (Oxoid MB1128A) ile biyokimyasal açıdan identifiye edildi. *Salmonella* izolasyonu için ise, ISO 6579 (ISO, 2002) yöntemi uygulandı.

Anket Uygulaması

Çalışmaya Afyon Kocatepe Üniversitesi Ahmet Necdet Sezer Kampüsü içinde yer alan 6 kantinde çalışan 45 kişi dahil edildi. Kantinlerde gıda güvenliği konusunda mikrobiyel kalite ile ilgili risk faktörlerine yönelik 27 sorudan oluşan bir anket uygulandı. Anket uygulamaları mikrobiyolojik

analizler için örnek toplama ile eş zamanlı olarak yapıldı. Araştırmada katılımcıların bilgi düzeyleri frekans ve yüzde dağılımları ile sunulmuş olup, değerlendirmelerde Ki-kare (χ^2) testi kullanıldı.

BULGULAR

İncelenen 100 adet gıda örneğinin %91'inde toplam Aerob Mezofil Bakteri (AMB) $\geq 10^3$ kob/g, %21'inde *Enterobacteriaceae* $\geq 10^2$ kob/g, %64'ünde koliform bakteri $\geq 10^2$ kob/g, %14'ünde *E. coli* $\geq 10^2$ kob/g, %25'inde *S.aureus* $\geq 10^2$ kob/g düzeylerinde bulundu. Gıda örneklerinin (tavuk şiş) 1'inden *Salmonella* spp., %3'ünden *L. ivanovii*, %5'inden *L. seeligeri*, %4'ünden *L. welshimeri* izole edilirken, *L. monocytogenes* ve sülfite indirgeyen anaerob bakteri saptanmadı.

Bıçak örneklerinin %77.5'inde AMB $\geq 10^3$ kob/g, %35'inde *Enterobacteriaceae* $\geq 10^2$ kob/g, %52.5'sinde koliform bakteri $\geq 10^2$ kob/g, %12.5'inde *E. coli*

$\geq 10^2$ kob/g, %17.5'inde *S.aureus* $\geq 10^2$ kob/g düzeylerinde identifiye edildi.

Yüzey örneklerinin ise; %55'inde AMB $\geq 10^3$ kob/g, %29.6'sında *Enterobacteriaceae* $\geq 10^2$ kob/g, 37'sinde koliform bakteri $\geq 10^2$ kob/g, %11'inde *E. coli* $\geq 10^2$ kob/g, %14.8'inde *S.aureus* $\geq 10^2$ kob/g düzeylerinde tespit edildi. Bıçak ve yüzey örneklerinden sülfite indirgeyen anaerob bakteri, *L. monocytogenes* ve *Salmonella* spp., izole edilmedi (Tablo 1).

El örneklerinin %40'ından *Enterobacteriaceae*, %51.1'inden koliform, %57.7'sinden *E. coli*, %57.7'sinden *S. aureus* izole edildi. Örneklerin %6.6'sında *Enterobacteriaceae* düzeyi >2.5 kob/cm² ve %8.8'inde >1.0 kob/cm²; koliform düzeyi %4.4'ünde >2.5 kob/cm² ve %15.5'inde >1.0 kob/cm²; *E. coli* düzeyi %14.7'sinde >1.0 kob/cm²; *S. aureus* düzeyi %15.5'inde >2.5 kob/cm² ve %15.5'inde >1.0 kob/cm² olarak belirlendi (Tablo 2).

Tablo 1: Gıda, bıçak ve yüzey örneklerinin mikrobiyolojik sonuçları

Table 1: Microbiological results of food, knife and surface samples

Örnek	Analiz edilen örnek sayısı	AMB $\geq 10^3$		<i>Enterobacteriaceae</i> $\geq 10^2$		Koliform $\geq 10^2$		<i>E. coli</i> $\geq 10^2$		<i>S. aureus</i> $\geq 10^2$		Sülfite indirgeyen anaerob		<i>Salmonella</i> spp.		<i>L. monocytogenes</i>	
		n	b (%)	n	b (%)	n	b (%)	n	b (%)	n	b (%)	n	b (%)	n	b (%)	n	b (%)
		Gıda	100	95	91	56	21	62	64	64	14	56	25	-	-	1	1
Bıçak	40	38	77.5	14	35	21	52.5	5	12.5	7	17.5	-	-	-	-	-	-
Yüzey	27	22	55	8	29.6	11	37	3	11	4	14.8	-	-	-	-	-	-

n: pozitif örnek sayısı

b: pozitif örnek yüzdesi

Tablo 2: Gıda çalışanlarının el hijyen profilleri

Table 2: Hand hygiene profiles of food handlers

Mikroorganizma	Pozitif örnek sayısı (%)	Hedefi aşan olumlu örnek sayısı
<i>Enterobacteriaceae</i> *	18(40)	3 (%6.6) ≥ 2.5 kob/cm ² 1(%8.8) ≥ 1 kob/ cm ²
Kolliform	23 (51.1)	2 (%4.4) ≥ 2.5 kob/cm ² 7 (%15.5) ≥ 1 kob/ cm ²
<i>E. coli</i>	29 (57.7)	8 (14.7) ≥ 1 kob/ cm ²
<i>S. aureus</i> *	29 (57.7)	7 (%15.5) ≥ 2.5 kob/cm ² 7 (%15.5) ≥ 1 kob/ cm ²

n: Farklı kantin ve kafeteryalardaki toplam el örneği sayısı

*: Hedef değer yok

TARTIŞMA

Gıda kaynaklı hastalıkların büyük çoğunluğunun, gıda hazırlama aşamasındaki yetersiz uygulamalardan kaynaklandığı bildirilmektedir (EFSA, 2010). Gıda çalışanları bu salgınlar ile uzun süredir ilişkilendirilmekte ve bu gidişatın azaldığına dair herhangi bir işaret bulunmamaktadır (Greig ve ark., 2007). Bu çalışmada, gıda çalışanlarının gıda güvenliğine ilişkin bilgi düzeylerinin doğru cevap skorunun (%66.7 ile %100 arası) yüksek düzeye sahip olduğu gözlenmiştir. Fakat el örneklerinden elde edilen sonuçların bu durumla paralellik göstermediği saptanmıştır. Benzer şekilde Romanya'da küçük ve orta ölçekli işletmelerde gıda çalışanlarına yapılan anket sonuçlarındaki doğru cevap skoru %63.2 olarak belirlenmiştir (Jianu ve Chiş, 2012). Genellikle eldiven kullanan gıda çalışanlarının el yıkama alışkanlığına sahip olmadığı (Pittet ve ark., 2000) bildirilmiştir. Gıda sektöründe çalışan personelin bilinçsiz ve belki de alışkanlıkla vücut bölgelerine dokunduktan sonra gıdaya temas etmeleri ve patojen bir bakteriyi gıdaya bulaştırabileceklerinin farkında olmamaları (Green ve ark., 2007), uyumsuz olmakta ısrarcı olmaları, rol modelin bulunmaması, (Pittet ve ark., 2000) ne zaman ellerini yıkayacaklarını bilmemeleri veya çoğunlukla yıkamamayı tercih etmeleri, kurumun el hijyenine önem vermemesi, el hijyeni etkisini bilmemesi, sabun ve dezenfektana ulaşamaması, kurumsal olarak düzenli şekilde el hijyen tanıtım, eğitim ve performans eksikliğinin geri bildirimini olmaması gibi faktörlerin bu sonuca etkili olduğu düşünülmektedir. Green ve ark., (2007) yaptıkları çalışmada, çalışanların %27'sinin el yıkama işlemini uygun olarak gerçekleştirdiklerini, %32'sinin ise bu prosedüre uymadıklarını, en sık rastlanan durumun ise sabun kullanmadan el yıkama alışkanlığı olduğunu bildirilmiştir. Lues ve Van Tonder, (2007) yaptıkları çalışmada, personel el örneklerinin %44'ünde *Enterobacteriaceae*'nin saptandığını, %32'sinde koliform bakteri, bir personeldeki *E. coli* düzeyinin yasal limitleri aştığını, *S. aureus* düzeyinin ise %88'inde $<9.8 \times 10^1$ kob/cm² olduğunu rapor etmişlerdir. Genel hijyen bilgisinin eğitim seviyesiyle direkt ilişkili olduğu, en sık verilen yanlış cevapların mikrobiyel risklere ilişkin, çapraz kontaminasyon ve sıcaklık kontrolleriyle ilgili sorulara ait olduğu bildirilmektedir (Jianu ve Chiş, 2012). Çalışanların yaptıkları işe yönelik tatmin duygularının gıda hijyen tutum ve davranışlarını önemli düzeyde etkilediği belirtilmektedir (Jevsnik ve ark., 2008; Ko, 2013). Ayrıca, kültürel ve sosyal gereksinimlerin, el hijyeni bilinciyle yakından alakalı olduğu, işe başlarken, her tuvalet çıkışında, hapşırma veya öksürme sonrasında, burun silme sonrasında, kirli malzemeye dokunduktan sonra ellerin yıkanması ve dezenfekte edilmesi gerektiği üzerinde önemle durulmaktadır (Juuma, 2005).

Yapılan birçok çalışmada, gıda çalışanlarının bilgi, genel durum ve gıda hazırlama uygulamaları incelemeye alınmıştır (Capunzo ve ark., 2005; Bas ve ark., 2006; Jevsnik ve ark., 2008; Santos ve ark., 2008; Ansari-Lari ve ark., 2010; Seaman ve Eves, 2010; Martins ve ark., 2012; Osaili ve ark., 2013). Bu çalışmaların tamamında, ilk olarak hizmet içi eğitim gereklilikleri belirlenmiş, verilen eğitimin etkinliği değerlendirilmiş ve iyi kalitede gıda üretimini sağlamak için eğitimlerin süreklilik arz etmesi gerektiği vurgulanmıştır. Hijyen tutum ve alışkanlıklarındaki yanlış uygulamaların sadece hijyen eğitimiyle alakalı olmadığı, bu duruma pek çok faktörün etkili olabileceği üzerinde durulmaktadır. Bunlar arasında en önemlileri; düşük eğitimli personel (Çakıroğlu ve Uçar, 2008), iş değişimi (Burch ve Sawyer, 1991), mevsimsel işçilik (Travis, 1986), düşük maaş ve statü (Rennie, 1994) olarak belirlenmiştir.

El yıkama uygulamalarında, klorheksidin, glukonat içeren antibakteriyel sabun, el dezenfektanları, kağıt havlu kullanımı gibi doğru yaklaşımlarda, el kontaminasyon düzeyinin kayda değer bir şekilde (3 log kob ve daha fazla) azaldığı, bu şekilde çapraz kontaminasyon riskinin de minimize edilebildiği kaydedilmiştir (Montville ve ark., 2010). Gıda ile temas halindeki yüzeylerin genel hijyenik durumlarının değerlendirilmesinde, koliformlar önemli yer tutmaktadır (Jackson ve ark., 2007). Bu çalışmada doğrama tahtalarının %29.6'sında *Enterobacteriaceae*, %37'sinde koliform, %11'inde *E. coli*, düzeyinin $\geq 10^2$ kob/ml olduğu saptanmış ve bu sonuçların temizlik standartlarındaki yetersizliğe işaret ettiği sonucuna varılmıştır. Aynı predominant mikrofloranın gıda çalışanlarının ellerinde ve bıçak saplarında da tespit edilmesi, potansiyel bir çapraz bulaşmanın var olduğunu düşündürmektedir. Bakteri, gıda ile temasta olan yüzeye tutunmakta ve bu şekilde gıdaya çapraz bulaşma riski artmaktadır (Chen ve ark., 2001; Montville ve ark., 2010; Zhao ve ark., 1998). Çapraz kontaminasyon olgularının özellikle yeterince dekontamine edilmemiş kesim tahtalarından (%58) ve bıçaklardan (%46) kaynaklandığı rapor edilmiştir (Redmond ve ark., 2004). En önemli aşamanın ise, ürünün dilimlenmesi sırasındaki uygulamalardan kaynaklandığı ortaya konmuştur (Uyttendaele ve ark., 1999; Little ve De Louvois 1998). Bu sebeple gıdalara el teması ve çapraz kontaminasyon özellikle tüketime hazır gıdalara (yıkamaya, ısı işlemine veya herhangi başka bir işleme gerek duyulmadan yenilebilecek nitelikte olan gıdalar) patojenlerin bulaşmasında potansiyel bir mekanizma olarak karşımıza çıkmaktadır (FDA/USDA, 2003). *E. coli* O157: H7, *L. monocytogenes*, *Camphylobacter jejuni* (*C. jejuni*), *Clostridium perfringens* (*Cl. perfringens*), *Salmonella* spp.

ve *S. aureus* (*Staphylococcus aureus*) hayvansal gıdalardan sıklıkla izole edilen, farklı ülkelerde geniş popülasyonları etkileyen hastalık vakalarına ve büyük ekonomik kayıplara yol açan bakteriler olarak bilinmektedirler (Milard ve Rockliff 2003; Elson ve ark., 2004; Colombari ve ark., 2007; Newell ve ark., 2010). *S. aureus*, *E. coli* ve *Salmonella* türlerinin ellerde ve yüzeylerde uzun süreler (günlerce) canlı kalabildiği bildirilmiştir (Kusumaningrum ve ark., 2002). Bu çalışmada, gıda örneklerinin %21'inde *Enterobacteriaceae*, %64'ünde koliform, %14'ünde *E. coli*, %25'inde *S. aureus* kontaminasyon düzeyi $\geq 10^2$ kob/g olarak tespit edilmiştir. Sadece bir örnekten *Salmonella* spp., izole edilirken, *L. monocytogenes* saptanmamıştır. Benzer bir araştırmada, İngiltere ve Kuzey İrlanda, tüketime hazır kurutulmuş ve fermente et ürünlerinden oluşan toplam 2981 örneğin %99'unun mikrobiyolojik kalite kriterleri bakımından kabul edilebilir limitlerde olduğu, örneklerin %1.3'ünün 10^2 kob/g'dan fazla *S. aureus* içerdiği, hiçbirinin verotoksijenik *E. coli* içermediği fakat sadece iki tanesinin *Salmonella* türleri ile kontamine olduğu ortaya konmuştur (Little, 1998). Bir başka çalışmada (Gillespie ve ark., 2000) da, tüketime hazır dilimlenmiş et ürünlerinin %26'sının kabul edilebilir hijyenik niteliğe sahip olmadığı, söz konusu örneklerde yüksek düzeyde *E. coli*, *S. aureus*, *Listeria* türleri ve/veya *C. perfringens* saptandığı belirtilerek tatmin edici olmayan bu sonuçların genelde yüksek AMB yüküne bağlı olduğu vurgulanmıştır. Christison ve ark. 2008, 70 adet şarküteri ürününde AMB 9 log kob/g, koliform 5 log kob/g, *E. coli* 6 log kob/g, *S. aureus* 2 log kob/g düzeylerinde tespit ettiklerini, örneklerin %4'ünün *L. monocytogenes*, %16'sının *Salmonella* spp., ile kontamine olduğunu rapor etmişlerdir. Yüzeylerden topladıkları örnekler arasında AMB bakımından en yüksek düzeyi kaşıklarda (5.1 log kob/g), doğrama tahtalarından ise koliform (4 log kob/g) ve *E. coli* (1.5 log kob/g) olarak saptadıklarını bildirmişlerdir.

SONUÇ

Gıda çalışanlarının ellerinde ve gıda temas yüzeylerinde indikatör ve bazı patojen mikroorganizmaların varlığı; iyi hijyen uygulamalarının noksanlığını, personel hijyen eksikliğini, işletme hijyen protokolündeki yetersizliği işaret etmektedir. Söz konusu patojen bakterilerden *S. aureus* genel olarak insanların burun mukozasında ve el ve yüz yaralarında bulunmakta ve personel eli ile gıdalara bulaşmaktadır. *E. coli*, genel olarak tuvalet hijyeni yetersizliğinden kaynaklanmakta ve yine gıda ile temas halinde olan personelin eli ile gıdaya bulaşmaktadır. Analiz edilen diğer bakteriler çapraz kontaminasyonda ve personel hijyeninde önem arz eden *Salmonella* spp.,

ve *L. monocytogenes*'den oluşmaktadır. Sülfid indirgeyen mikroorganizmalar ise, muhtemel bir anaerob patojenin varlığına işaret etmesi bakımından değerlendirmeye alınmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, yanlış uygulamaların düzeltilmesi konusunda çözüm önerileri sunulması ve bu vesileyle halk sağlığının korunmasına yönelik önemli bir adım atılmış olması bakımından önem teşkil etmektedir. Ayrıca bu çalışma sonuçları, çalışanların ellerindeki ve gıda temas yüzeylerindeki kontaminantların son ürüne taşınmasının önlenmesi konusunda düzenlenecek eğitimlerin çerçevesini belirlemede fayda sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Abdul-Mutalib NA, Abdul-Rashid MF, Mustafa S, Amin-Nordin S, Hamat RA, Osman M.** Knowledge, attitude and practises regarding food hygiene and sanitation of food handlers in Kuala Pilah, Malaysia. Food Control. 2012; 27: 289-293.
- Afoakwa EO.** Enhancing the quality of school feeding programme in Ghana. The Global Child Nutrition Forum 2005; Baltimore, Maryland, USA. (Available at:http://works.bepress.com/emmanuelohe_neafoakwa/40).
- Ansari-Lari M, Soodbakhsh S, Lakzadeh L.** Knowledge, attitudes and practices of workers on food hygienic practices in meat processing plants in Fars, Iran. Food Control. 2010; 21: 260-263.
- Aycicek H, Aydogan H, Küçükaraaslan A, Baysallar M, Baoustaoflu AC.** Assessment of the bacterial contamination on hands of hospital food handlers. Food Control. 2004; 15: 253-259.
- Bas M, Ersun AS, Kıvanç G.** The evaluation of food hygiene knowledge, attitudes, and practices of food handlers' in food businesses in Turkey. Food Control. 2006; 17(4): 317-322.
- Blood RM, Curtis GDW.** Media for 'total' enterobacteriaceae, coliforms and Escherichia coli. International Journal of Food Microbiology. 1995; 26(1): 93-115.
- Bolton DJ, Meally A, Blair IS, McDowell DA, Cowan C.** Food safety knowledge of head

- chefs and catering managers in Ireland, *Food Control*. 2008; 19(3): 291-300.
- Borch E, Arinder P.** Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat products as well as control measures. *Meat Science*. 2002; 62: 381-390.
- Burch NL, Sawyer CA.** Food handling in convenience stores: the impact of personnel knowledge on facility sanitation. *Journal of Environmental Health*. 1991; 54(3): 23-27.
- Çakıroglu FP, Uçar A.** Employees' perception of hygiene in the catering industry in Ankara, Turkey. *Food Control*. 2008; 19(1): 9-15.
- Capunzo M, Cavallo P, Boccia G, Brunetti L, Buonomo R, Mazza G.** Food hygiene on merchant ships: the importance of food handlers' training. *Food Control*. 2005; 16: 183-188.
- Chaibenjawong P, Foster SJ.** Desiccation tolerance in *Staphylococcus aureus*, *Archives of Microbiology*. 2011; 193(2): 125-135.
- Chen Y, Jackson, KM, Chea FP, Schaffer DW.** Quantification and variability analysis of bacterial cross contamination rates in common food service tasks. *Journal of Food Protection*. 2001; 64(1): 72-80.
- Christison CA, Lindsay D, von Holy A.** Microbiological survey of ready-to-eat foods and associated preparation surfaces in retail delicatessens, Johannesburg, South Africa. *Food Control* 2008; 19: 727-733.
- Colombari V, Mayer M, Laicini ZM, Mamizuka E, Franco B, Destro MT, Landgraf M.** Foodborne Outbreak Caused by *Staphylococcus aureus*: Phenotypic and Genotypic Characterization of Strains of Food and Human Sources. *Journal of Food Protection*. 2007; 70(2): 489-493.
- Cordoba M, Cordoba J, Jordano R.** Microbiological hazards during processing of croquettes. *Journal of Food Safety*. 1999; 19 1-15.
- Department of Health South Africa.** Guidelines for environmental health officers on the interpretation of microbiological analysis data of food, Directorate. *Food Control*. 2001; Pretoria, Government Printer.
- De Boer E.** Update on media for isolation of enterobacteriaceae from foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1998; 45(1): 43-53.
- Egan MB, Raats MM, Grubb SM, Eves A, Lumbers ML, Dean MS, Adams MR.** A review of food safety and food hygiene training studies in the commercial sector. *Food Control*. 2007; 18(10): 1180-1190.
- Ehiri JE, Morris GP.** Hygiene training and education of food handlers: does it work? *Journal of Ecology of Food and Nutrition*. 1996; 35: 243-251.
- Elson R, Burgess F, Little CL, Mitchell R.T.** Microbiological examination of ready-to-eat cold sliced meats and pâté from catering and retail premises in the UK. *Journal of Applied Microbiology*. 2004; 96: 499-509.
- European Food Safety Authority (EFSA).** The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *The EFSA Journal*. 2010; 1: 1410-1496.
- FDA/USDA.** Food and Drug Administration/United States Department of Agriculture. Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready to eat foods. 2003; available from <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmr2-toc.html>.
- Gelatti LC, Bonamigo RR, Becker AP, d'Azevedo PA.** *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2009; 84: 501-516.
- Gillespie I, Little CL, Mitchell R.** Microbiological examination of cold ready-to-eat sliced meats from catering establishments in the United Kingdom. *Journal of Applied Microbiology*. 2000; 88: 467-474.
- Green LR, Radke V, Mason R, Bushnell L, Reimann DW, Mack JC.** Factors related to food worker hand hygiene practice. *Journal of Food Protection*. 2007; 70: 661-666.
- Greig JD, Todd EC, Bartleson CA, Michaels**

- BS.** Outbreaks where food workers have been implicated in spread of foodborne disease, Part 1. description of the problem, methods, and agents involved. *Journal of Food Protection.* 2007; 70: 1752-1761
- Gomes-Neves E, Araújo AC, Ramos E, Cardoso CS.** Food handling: comparative analysis of general knowledge and practice in three relevant groups in Portugal. *Food Control.* 2007; 18(6): 707-712.
- Howes M, Mcewen S, Griffiths M, Harris L.** Food handler certification by home study: measuring changes in knowledge and behavior. *Dairy Food Environmental Sanitation.* 1996; 16: 737-744.
- International Organization for Standardization (ISO 6579).** Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. International Standard 2002; Geneva, Switzerland.
- International Organization for Standardization (ISO 15213).** International Organization for Standardization. 2003; Geneva, Switzerland.
- International Organization for Standardization (ISO 11290-1/A1).** International Organization for Standardization. 2004; Geneva, Switzerland.
- Jackson V, Blair IS, McDowell DA, Kennedy J, Bolton DJ.** The incidence of significant foodborne pathogens in domestic refrigerators. *Food Control.* 2007; 18: 346-351.
- Jevsnik M, Hlebec V, Raspor P.** Food safety knowledge and practices among food handlers in Slovenia. *Food Control.* 2008; 19(12): 1107-1118.
- Jianu C, Chiş C.** Study on the hygiene knowledge of food handlers working in small and medium-sized companies in western Romania. *Food Control.* 2012; 26: 151-156.
- Juuma PA.** Hand hygiene: simple and complex. *International Journal of Infectious Diseases.* 2005; 9: 3-14.
- Kusumaningrum HD, Van Putten MM, Rombouts FM, Beumer RR.** Effects of antibacterial dishwashing liquid on foodborne pathogens and competitive microorganisms in kitchen sponges. *Journal of Food Protection.* 2002; 65: 61-65.
- Ko WH.** The relationship among food safety knowledge, attitudes and self-reported HACCP practices in restaurant employees. *Food Control.* 2013; 29(1): 192-197.
- Little CL, De Louvois J.** The microbiological examination of butchery products and butchers premises in the United Kingdom. *Journal of Applied Microbiology.* 1998; 85(1): 177-186.
- Little CL.** The microbiological quality of ready-to-eat dried and fermented meat and meat products. *International Journal of Environmental Health Research.* 1998; 8(4): 277-284.
- Lues JFR, Van Tonder I.** The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail Group. *Food Control.* 2007; 8: 326-332.
- Malm KL, Nyarko KM, Yawson AE, Gogo B, Lawson A, Afari E.** Foodborne illness among school children in Ga East, Accra. *Ghana Medical Journal.* 2015; 49(2): 72-76.
- Martins RB, Hogg T, Otero JG.** Food handlers' knowledge on food hygiene: the case of a catering company in Portugal. *Food Control.* 2012; 23: 84-190.
- Marzono MA, Balzaretta CM.** Protecting child health by preventing school-related foodborne illnesses: microbiological risk assessment of hygiene practices, drinking water and ready-to-eat foods in Italian kindergartens and schools. *Food Control.* 2013; 34(2013): 560-567.
- McIntyre L, Vallaster L, Wilcott L, Henderson SB, Kosatsky T.** Evaluation of food safety knowledge, attitudes and self-reported hand washing practices in foodsafe trained and untrained food handlers in British Columbia, Canada. *Food Control.* 2013; 30(1): 150-156.
- Meldrum RJ, Mannion PT, Garside J.** Microbiological quality of ready-to-eat food served in schools in Wales, United Kingdom. *Journal of Food Protection.* 2009; 72(1): 197-201.

- Millard G, Rockliff S.** Microbiological quality of sushi. 2003; available from: <http://www.health.act.gov.au/c/health?ada&did=10060511&pid=1094601516>.
- Montville R, Chen Y, Schaffner D.** Gloves barriers to bacterial cross-contamination between hands to food. *Journal of Food Protection*. 2010; 64: 845-849.
- Moore G, Griffith CA.** Comparison of surface sampling methods for detecting coliforms on food contact surfaces. *Food Microbiology*. 2002; 19: 65-73.
- Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Aidara A, Sprong KH, Opsteegh M, Merel L, Threlfall J, Scheutz F, vander Giessen J, Kruse H.** Food-borne diseases-The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge, Author links open overlay panel. *International Journal of Food Microbiology*. 2010; 139 (30): 3-15.
- Oranusi S, Umoh VJ, Kwaja JKP.** Energy intake and anthropometry: a case study of families in Zaria Nigeria. *AJB*. 2007; 6(4): 459-464.
- Osaili TM, Abu Jamous DO, Obeidat BA, Bawadi HA, Tayyem RF, Subih Hadil S.** Food safety knowledge among food workers in restaurants in Jordan. *Food Control*. 2013; 31: 145-150.
- Pittet D, Hugonnet S, Harbarth S, Morouga P, Sauvan V, Touveneau S.** (2000). Effectiveness of a hospital-wide programme to improve compliance with hand hygiene. *Lancet*. 356:1307-12.
- Rennie DM.** Evaluation of food hygiene education. *British of Food Journal*. 1994; 96(11): 20-25.
- Redmond EC, Griffith CJ, Slader J, Humphrey TJ.** Microbiological and observational analysis of cross contamination risks during domestic food preparation. *British of Food Journal*. 2004; 106(8): 581-597.
- Rotter M.** Hand washing and hand disinfection In: Mayhall CG (ed). *Hospital epidemiology and infection control*. Philadelphia, 1999; PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Ryu J, Ko J, Park H, Yang S, Kim H.** Microbiological examination of nonheated foods served in feeding programmes of elementary schools, Iksan City, Jeonbuk Province, Korea. *Journal of Food Protection*. 2011; 47(9): 1564-1568.
- Santana NG, Almeida RCC, Ferreira S J, Almeida FB.** Microbiological quality and safety of meals served to children and adopted good manufacturing practices in public school catering in Brazil. *Food Control*. 2009; 20: 255-261.
- Santos MJ, Nogueira JR, Patarata L, Mayan O.** Knowledge levels of food handlers in Portuguese school canteens and their self-reported behaviour towards food safety. *International Journal of Environmental Health Research*. 2008; 18 (6): 387-401.
- Schweon SJ, Edmonds SL, Kirk J, Rowland DY, Acosta C.** Effectiveness of a comprehensive hand hygiene program for reduction of infection rates in a long-term care facility. *American Journal of Infection Control*. 2013; 41: 39-44.
- Scott E, BloomWeld SF.** The survival and transfer of microbial-contamination via cloths, hands and utensils. *Journal of Applied Bacteriology*. 1990; 68: 271-278.
- Seaman P, Eves A.** Food hygiene training: introducing the food hygiene training model. *Food Control*. 2010; 21(4): 381-387.
- Sharif L, Al-Malki T.** Knowledge, attitude and practice of Taif University students on food poisoning. *Food Control*. 2010; 21: 55-60.
- Soares LS, Rogeria CC, Almeida RCC, Cerqueira ES, Carvalho JS, Nunes IL.** Knowledge, attitudes and practices in food safety and the presence of coagulase-positive staphylococci on hands of food handlers in the schools of Camaçari, Brazil. *Food Control*. 2012; 27: 206-213.
- Syne SM, A Ramsubhag, Adesiyun AA.** Microbiological hazard analysis of ready-to-eat meats processed at a food plant in Trinidad, West Indies, *Infection Ecology and Epidemiology*. 2013; 3(1): 1-12.
- Talero K, Talero A.** *Foundations in microbiology* 2nd edition Mc-Graw Hill Publishers USA. 1996; pp. 840-841.
- Tokuç B, Ekuklu G, Berberoglu U, Bilge E, Dedeler H.** Knowledge, attitudes and self-

reported practice of food service staff regarding food hygiene in Edirne, Turkey. *Food Control*. 2009; 20(6): 565-568.

Travis HR. Training for seasonal foodservice operation. *Journal of Environmental Health*. 1986; 48(5): 265-267.

Uyttendaele M, De Troy P, Debevere J. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different types of meat products on the Belgian retail market. *International Journal of Food Microbiology*. 1999; 53: 75-80.

Walker E, Pritchard C, Forsythe S. Food handlers hygiene knowledge in small food businesses. *Food Control*. 2003; 14(5): 339-343.

WHO (World Health Organisation). Guidelines on hand hygiene in health care. 2009; www.who.int.
www.who.int/gpsc/5may/tools/9789241597906/en/

WHO (World Health Organisation). Manual for integrated foodborne disease surveillance in the WHO African Region Brazzaville. 2012; WHO Regional Office for Africa.

WHO (World Health Organisation). Strategic plan for food safety including foodborne zoonoses 2013-2022. 2013; available at: <http://www.who.int/foodsafety/strategic-plan/en/> Retrieved June 25, 2017.

WHO (World Health Organisation). WHO's first ever globalestimates of foodborne diseases find children under 5 account for almost one third of deaths. 2015, available at: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/foodborne-disease-estimates/en/>. Retrieved June 25, 2017.

Zhao P, Zhao T, Doyle MP, Rubino JR, Meng J. Development of a model for evaluation of microbial cross-contamination in the kitchen. *Journal of Food Protection*. 1998; 61: 960-963.

17 β -Östradiolün Overioktomize Ratlarda Spontan Myometriyal Kasılımlar Üzerine Etkisi[#]

Özlem YILDIZ GÜLAY^{1*}, Aziz BÜLBÜL²

¹Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Burdur, Türkiye
²Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, Türkiye

[#]Afyon Kocatepe Üniversitesi Araştırma Fonu 07.VF.03 Proje numarası ile desteklenmiş ve aynı isimli tezden özetlenmiştir. Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (AKÜHEK-44-08/203).

*Corresponding author e-mail: oygulay@mehmetakif.edu.tr

ÖZ

Çalışma farklı doz ve sürelerde uygulanan 17 β -östradiolün ovaryumları çıkarılmış sıçanlarda spontan myometriyal kasılımlar üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Araştırmada 3-6 aylık ve ortalama 270 \pm 20 g ağırlığında, 72 adet Sprague Dawley cinsi dişi sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar, her grupta 18 sıçan bulunacak şekilde, kontrol (Ov) ve 3 deneme grubuna (östrojen) ayrılmıştır. Kontrol grubuna günlük olarak kas içi susam yağı enjeksiyonları yapılmış (0,2 ml), birinci deneme grubundaki sıçanlara günlük 25 μ g 17 β -östradiol, ikinci deneme grubundaki sıçanlara günlük 50 μ g 17 β -östradiol, ve üçüncü deneme grubundaki sıçanlara günlük 100 μ g 17 β -östradiol kas içi uygulanmıştır. Her grup kendi arasında 3 alt gruba ayrılarak 18, 90 ve 162. saatlerde 6'şar hayvan genel ötenazi yapılmıştır. Nitrik oksitin etkinliğinin belirlenmesi amacıyla L-Arginin SNP ve L-NNA (Nitro-N-Arginin) uygulaması yapıldı. Alınan uterus örneklerinden elde edilen doku kesitlerinde cGMP-PK1 ekspresyonunu göstermek için immunohistokimyasal yöntemle boyandı. Uygulama sonrası östrojen verilen gruplarda spontan myometriyal kasılımların şiddeti, östrojenin dozuna ve süresine bağlı olarak arttı. Ayrıca, östrojenin L-arginin-NOS-NO-cGMP yolunun etkinliğini engellediği belirlendi. Östrojenin uterusunda bulunan longitudinal düz kaslarda cGMP-PK1 ekspresyonu üzerine etkisinin bulunmadığı görüldü. Sonuç olarak östrojenin doza ve süreye bağımlı olarak uterus kasılımlarının şiddetini artırırken, L-Arginin-NOS-NO- cGMP-PK1 yolunun etkinliğini engellediği fakat bu engellenmenin cGMP-PK1 üzerinden olmadığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: 17 β -östradiol, Myometriyum, cGMP'ye bağımlı protein kinaz, NOS.

Effects of 17 β -Estradiol on Spontaneous Myometrial Contractions in Ovariectomized Rats

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of injecting different doses and time intervals of 17 β -estradiol on spontaneous myometrial contractions of ovariectomized rats. Three to 6 months old 72 female Sprague Dawley rats, weighing 270 \pm 20 g, were used in the current study. The ovariectomized rats were randomly assigned to a control (Ov) and three experimental groups (17 β -estradiol injected) of 18 rats each. Rats in the Ov group received daily sesame oil (0.2 ml, IM), whereas each rat in the three experimental groups was treated with daily 25, 50 and 100 μ g estradiol (IM), respectively. Each group was further divided into 3 subgroups: 6 rats in each group were sacrificed by cervical dislocation at 18, 90 and 162 hr. In order to determine endogenous nitric oxide activity, the L-arginine solution was used. Sodium nitroprusside (SNP) was used for evaluation of the exogenous nitric oxide pathway. In addition, L-NNA (nitro-N-arginine) treatment was applied in order to determine the effect of endogenous NO at the receptor level. Immunohistochemical evaluation was performed to determine the cGMP-PK1 expression from the uterus samples. In the current study, estrogen treatment increased spontaneous myometrial contraction in a dose and time-dependent manner. Moreover, estrogen treatments inhibited L-arginine-NOS-NO-cGMP pathway. On the other hand, estrogen failed to have any effect on cGMP-PK1 expression in uterine longitudinal smooth muscles. Thus, 17 β -estradiol treatments increased the uterine smooth muscle cell contractions. The treatments also inhibited L-Arginine-NOS-NO-cGMP-PK1 pathway. However, our results indicated that 17 β -estradiol did not show its effect through cGMP-PK1.

Keywords: 17 β -estradiol, myometrium, cGMP-dependent protein kinase, NOS.

To cite this article: Gülay Yıldız Ö. Bülbül A. 17 β -Östradiolün Overioktomize Ratlarda Spontan Myometriyal Kasılımlar Üzerine Etkisi. Kocatepe Vet J. (2018) 11(4): 374-384.

GİRİŞ

Östrojen hormonu myometriyal kasılmalar için gerekli olan kontraktıl proteinlerin, düzenleyici enzimlerin ve koneksin 43'ün sentezlenmesini arttırdığından, uterus düz kaslarında kasılmaları da şiddetlendirmektedir (Petrocelli ve Lye 1993; Weiss G 2000). Östrojen gebe ve gebe olmayan uterustaki oksitosin reseptörlerini ve β -adrenerjik ajanları artırarak membran kalsiyum kanalları üzerine de etki etmektedir (Richter, 2004). Östradiol uygulaması sonucunda bazal kasılma düzeylerinde değişiklik meydana gelmekte ve rat myometriyal dokuda oksitosin ve PGF2 β 'ya karşı duyarlılık artmaktadır (Vedernikov, 2003). Benzer bir şekilde, ovaryumları çıkartılmış (Ov) ratlarda östrojen tedavisinin PGF2 β mRNA düzeylerinde farklılık oluşturmadan PGF2 β 'ya karşı duyarlılıkta artışa sebep olduğu (Gordan ve ark. 2007), aynı zamanda folliküler dönemde uterustaki kasılım şiddetinin östrojene bağlı olarak arttığı ifade edilmektedir (Abramowicz ve Archer 1990; Oike ve ark. 1990).

Nitrik oksitin mide bağırsak (Bülbül ve ark. 2014) ve damar düz kaslarında (Eckman ve ark. 1994) kasılmaları baskılayıcı etkisinin bulunduğu bilinmektedir. Son zamanlarda östrojenin uterus kasılmaları üzerine etkilerinde nitrik oksidin de aracılık edebileceği üzerinde durulmaktadır. Ovaryum ve uterus dokusunda nitrik oksit oluşumundan sorumlu NOS enzimleri (iNOS, eNOS ve nNOS) çeşitli hayvan türlerinde gösterilmiştir (Kuenzli ve ark. 1998; Challis ve ark. 2000; Bülbül ve ark. 2013). İnsan myometriyumundaki iNOS mRNA'sına doğum öncesinde en yüksek düzeylerde rastlanırken, doğumda ise en düşük düzeylerde olduğu gösterilmiştir (Challis ve ark. 2000). Benzer şekilde uterus ve ovaryumda NOS enzim etkinlikleri menstürasyon siklusuna (Vedernikov ve ark. 2003), beslenme ve yaşa bağlı olarak değişmektedir (Bülbül ve ark. 2015a; 2015b). Ovaryumları çıkartılmış sıçanlarda nitrik oksit donörü L-Arginin uygulaması uterus kaslarında gevşemeye yol açarken, 10 gün süre ile 10 μ g/gün 17 β -östradiol verilen sıçanlarda L-Arginin uygulamasının uterus kasındaki kasılmalar üzerine gevşetici etkisi gözlenmemiştir. Aynı çalışmada SNP uygulamasının uterusta gevşemeye yol açtığı, fakat bu etkinin 10 gün boyunca 10 μ g dozunda 17 β -östradiol verilen sıçanlarda ortadan kalktığı gözlenmiştir (Bulbul ve ark. 2007a). Yine Ov sıçanlarda 10 gün boyunca 10 μ g dozunda verilen 17 β -östradiol uterustaki kasılmaların şiddetini arttırırken myometriyal kasılım sıklığını Ov grubuna göre azaltmıştır (Bulbul ve ark. 2007b). Bu bulgular 17 β -östradiolün NO üzerine olan etkisinin myometriyumdaki cGMP-PK1 ekspresyonu üzerine olabileceğini düşündürmektedir. Daha

önceki çalışmalarda östrojen uygulamalarının uterus kasılmalarını arttırdığına (Vedernikov ve ark. 2003; Bulbul ve ark. 2007b) veya uterus kasılmalarını durdurduğuna dair bildirimler bulunmaktadır (Gordon ve ark. 2000). Ayrıca literatürlerde farklı doz ve süreye bağlı olarak 17 β -östradiolün uterus kasılmaları ve cGMP-PK1 üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada sıçanlarda 17 β -östradiolün doza ve süreye bağlı olarak uterus kasılmaları üzerine etkisinin belirlenmesi yanı sıra, bu etkilerin ortaya çıkmasında cGMP-PK1'in rolünün değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Araştırmada 3-6 aylık ve ortalama 270 \pm 20 gr ağırlığında, 72 adet Sprague Dawley cinsi dişi sıçan kullanıldı. Çalışmaya başlamadan önce sıçanlara genel anestezi (21,1 mg/kg ketamin ve 4,2 mg/kg ksilazin) altında ovariektomi uygulandı. Ovariektomiden 2 hafta sonra sıçanların genel muayeneleri yapılarak her grupta 18 sıçan bulunacak şekilde, kontrol (Ov) ve 3 deneme grubuna (östrojen) ayrıldı. Araştırmada kontrol ve östrojen gruplarındaki sıçanlara uygulanan prosedür Tablo 1'de verilmektedir.

Özetle kontrol grubuna susam yağı (0,2 ml/sıçan/gün IM), deneme gruplarına ise her bir sıçan için 0,2 ml susam yağında çözdürülmüş 17 β -östradiolden birinci deneme grubu (Östrojen 1) sıçanlara 25 μ g/sıçan/gün, ikinci deneme grubu sıçanlara (Östrojen 2) 50 μ g/sıçan/gün ve üçüncü deneme grubundaki sıçanlara (Östrojen 3) 100 μ g/sıçan/gün kas içi altı gün uygulandı.

Her grup kendi içinde üç alt gruba ayrılarak 18., 90. ve 162. saatlerde 6'şar hayvan genel anestezi altında etik kurallara uygun olarak boyun eklemlerinden disloke edilerek ötenazi yapıldı.

İzole Organ Banyosu

Ötenaziye takiben karın bölgesi hemen açılarak kornu uteriler zarar verilmeden çıkarıldı. İzole edilen her bir kornu, krebs çözeltisi (NaCl 118; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; MgSO₄ 1; KH₂PO₄ 1; NaHCO₃ 25 ve glikoz 11 mM) içerisine alındı. Sonra uterus etrafındaki mezenter ve yağ dokudan dikkatli bir şekilde temizlenerek 0,1 – 0,3 cm x 0,8 cm boyutlarında şerit şeklinde doku parçası elde edildi. Hazırlanan bu preparatlar, 37 °C sıcaklıkta ve %95 O₂ - %5 CO₂ gaz karışımı ile sürekli havalandırılan 20 ml krebs çözeltisi içerisinde olacak şekilde izole organ banyosunun I ve II numaralı olmak üzere her iki kadehindeki platin halka elektrotun alt ucuna bağlanarak dokunun halka elektrotlar arasında kalması sağlandı. Dokunun diğer ucu üst uçlarından force transducer'a bağlanıp tespit edildi

ve izometrik düz kas hareketleri “force transducer” ve “acquisition system” yardımı ile bilgisayarda görüntülenerek kaydedildi.

Uterusta İzometrik Kasılımların Belirlenmesi

Dokulara uygulanan deney protokolü Tablo 2’de gösterilmektedir. Özetle organ banyosunun kadehlerine tespit edilen doku parçaları ortama alışmaları için 1 saat süreyle krebs çözeltisi içerisinde bekletildi. Öncelikle spontan kasılımların belirlenmesi için 45 dakikalık kasılım periyodu kaydedildi. Takiben Electric Field Stimulation (EFS) ile her iki doku için submaksimal kasılımın sağlandığı voltaj, frekans ve uyarı derinliği değerleri tespit edildi. Bunun için dokuya çeşitli düzeylerde elektrik akımı (10, 20, 30, 40 volt) farklı sürelerde (0,25, 0,5, 1 ms) ve sıklıkta (frekans) (2, 4, 8, 16, 32, 64 Hz) uygulandı (Oike ve ark. 1990). En şiddetli kasılımın meydana geldiği ortalama frekans değeri 32 Hz, uyarı derinliği 1 ms ve voltaj yüksekliği ise 20 volt olarak tespit edildi.

Endojen NO etkinliğinin belirlenmesi amacıyla EFS varlığında L-Arginin 1µM den 1 mM, eksojen NO yolunun değerlendirilmesi amacıyla SNP 10 nM den 0.1 mM dozlarında logaritmik olarak artırılarak her on dakikada bir izole organ banyosuna ilave edildi (Tablo 2). Endojen NO etkisinin enzimsel düzeyde etkisinin ortaya konulması için EFS varlığında 100 mmol/L L-NNA verildikten sonra L-Arginin 1mM dozunda izole organ banyosuna eklendi.

Myometriyumda cGMP-PK1’in İmmunohistokimyasal Boyanması

Alınan uterus örnekleri % 10 tamponlu formaldehit ile 24 saat tespit edildi. Tespitten sonra doku örneklerinin histolojik takipleri yapılarak parafin bloklara gömüldü. Bloklardan 4–5 µ’luk kesitler alınarak immunhistokimyasal yöntemle boyandı (Misirlioglu ve ark. 2000). İmmunhistokimyasal yöntem olarak indirekt streptavidin-biotin peroksidaz yöntemi kullanıldı. Buna göre: Asit-alkolle temizlenmiş ve poli-L-lizin ile kaplanmış olan lamlara 4-5µ’luk doku kesitleri alındı ve kesitler 60 °C’lik etüvde 1 saat bekletildi.

Preparatlar ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek, antijen retrieval için pH 6 olan Sitrata buffer içerisinde mikrodalga fırında 700 watt’da 3 kez 5’er dakika kaynatıldı. Endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için distile suda hazırlanmış % 3’lük Hidrojen peroksit ile 10 dakika inkübe edildi. Anti rabbit poliklonal IgG primer antikor (1/500 dilüsyon) ile preparatlar nemli ortamı sağlayan bir kap içerisinde 37 oC’de 30 dakika inkübe edildi. Preparat biotinli sekonder antikor ile oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. Enzim olarak Streptavidin-HRP ile preparatlar oda sıcaklığında

20 dakika inkübe edildi. DAB substrat-kromojen solüsyonunda 5 dakika tutularak, Harris Hematoksilin ile 30 saniye zıt boyama yapıldı. Alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı (Misirlioglu ve ark. 2000).

İmmunohistokimyasal Değerlendirme

Birbirinden bağımsız iki araştırmacı tarafından immunohistokimyasal boyamaların değerlendirmeleri reaksiyonun şiddetine ve dağılımına bakılarak yapıldı. Reaksiyonun şiddeti yönünden boyanmanın olmaması 0, zayıf reaksiyon 1, orta şiddetli reaksiyon 2, şiddetli reaksiyon 3 olarak değerlendirildi. Reaksiyonun dokudaki dağılımına göre aşağıdaki skorlama yapıldı: Reaksiyonun olmaması = 0; <1% = 1; %2-10 = 2; %11-30 = 3; %31-65 = 4; % >65 = 5 Reaksiyonun şiddeti ve dağılımından elde edilen skor değerleri toplanarak immunohistokimyasal boyama skor değeri elde edildi (Misirlioglu ve ark. 2000).

Bu çalışmada istatistiksel analizler için ‘SPSS 13.0 istatistik paket programı’ kullanıldı. İzole organ banyosu değerlendirmelerinde gruplar arasında fark olup olmadığının belirlenmesinde, dokularda cGMP’ye bağımlı PKG değerlendirilmesinde ve immunohistokimyasal değerlendirme sonucu elde edilen verilerin önem gösterip göstermediğinin belirlenmesinde Tek Yönlü Varyans Analizi, farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek için ise Tukey testi yapıldı.

BULGULAR

Spontan kasılımların şiddeti ve frekansı

Gruplarda 18, 90 ve 162. saat sonunda spontan myometriyal kasılımların şiddeti ve sıklığı Tablo 3’ de gösterilmiştir. Spontan myometriyal kasılımların şiddetinin 18. saatte 50 ve 100 µg 17β-östradiol gruplarında, 90 ve 162 saatlerde ise tüm uygulama gruplarında kontrol grubuna göre arttığı görüldü (p<0,001). Spontan myometriyal kasılımların frekansının ise tüm saat ve uygulama gruplarında kontrol grubuna göre azaldığı görüldü (p<0,001).

Gruplarda L-Arginin Uygulamasının Kasılım Şiddetine Etkisi

Gruplarda 18., 90. ve 162. saatlerde uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-Arginin (10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M, 10⁻³ M) ve NNA (10⁻³ M) + L-Arginin (10⁻³ M) varlığında elektriksel uyarımın oluşturduğu kasılımlara ait doz-cevap eğrisi Grafik 1’de gösterilmektedir. Buna göre L-arginin 18 ve 90 saatlerde Kontrol ve 25 µg 17β-östradiol gruplarında dozuna bağımlı olarak kasılım şiddetini azaltırken (p<0.05); aynı saatlerde 50 µg 17β-östradiol ve 100 µg 17β-östradiol gruplarında, 162.

saatte ise üç deneme grubunda da istatistiksel olarak gevşetici etki oluşturmadı. Aynı zamanda 18 ve 90. saatlerde kontrol ve 25 µg 17β-östradiol grubunda NNA uygulamasının L-Argininin (10⁻³ M) etkisini ortadan kaldırdığı görüldü.

Gruplarda SNP uygulamasının kasılım şiddetine etkisi

Gruplarda 18., 90. ve 162. saatlerde uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP (10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M) varlığında elektriksel uyarımın oluşturduğu kasımlara ait doz-cevab eğrisi Grafik 2'de gösterilmektedir. Buna göre kontrol grubunda 18, 90 ve 162'inci saatlerde SNP'nin en düşük iki dozu (10⁻⁸ ve 10⁻⁷ M) etkili olmazken, diğer dozlarında doza bağımlı olarak gevşeme şekillendiği saptandı. Benzer etki östrojen uygulanan tüm gruplarda 18 saat sonunda belirlenirken, 90 saatte sadece 25 µg 17β-östradiol grubunda SNP'nin en yüksek dozu olan 10⁻⁵ M düzeyinde görüldü. 162. saat sonunda 17β-östradiol verilen grupların hiç birisinde SNP'nin gevşemeye yol açmadığı gözlemlendi.

Östrojenin Doza ve Süreye Bağlı Olarak cGMP-PK1 Dağılımına Etkisi

Gruplarda 18., 90. ve 162'nci saat sonunda cGMP-PK1 immunreaksiyonunun boyama skorları Tablo 3'de gösterilmektedir. Uterustaki sirküler kaslarda 18'inci saatte cGMP-PKG boyama skoru değeri 25 ve 100 17β-östradiol gruplarında Ov grubuna göre yüksek bulundu. Sirküler kaslarda 18'inci saatteki en düşük cGMP-PK1 boyama skor değeri 50 µg 17β-östradiol grubunda gözlemlendi (Resim 1). 90. saatte ise, cGMP-PK1 boyama skor değeri bakımından kontrol ile 50 ve 100 µg 17β-östradiol grupları arasında fark görülmezken 25 µg 17β-östradiol grubunun 50 ve 100 µg 17β-östradiol gruplarına göre azaldığı belirlendi (Resim 2). Myometriumda sirküler kas hücrelerinde 162'nci saat sonunda cGMP-PK1 dağılımında gruplar arasında istatistiki bir fark saptanmadı. Benzer şekilde uterustaki longitudinal kaslarda doza ve şiddete bağlı olarak cGMP-PK1 dağılımında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir.

Tablo 1: Araştırma prosedürü

Table 1: Research procedure

Grup	Alt grup	Uygulama	Ötenazi zamanı
Kontrol (Ov)	18'inci saat	0,2 ml susam yağı/sıçan/	Uygulama sonrası 18. saat
Kontrol (Ov)	90'inci saat	0,2 ml susam yağı/sıçan/gün (3gün)	Son uygulamadan 18 saat sonra
Kontrol (Ov)	162'nci saat	0,2 ml susam yağı/sıçan/gün (6 gün)	Son uygulamadan 18 saat sonra
25µg 17β-östradiol	18'inci saat	17β-östradiol 25 µg/sıçan	Uygulama sonrası 18. saat
25µg 17β-östradiol	90'inci saat	17β-östradiol 25 µg/sıçan/gün (3gün)	Son uygulamadan 18 saat sonra
25µg 17β-östradiol	162'nci saat	17β-östradiol 25 µg/sıçan/gün (6gün)	Son uygulamadan 18 saat sonra
50µg 17β-östradiol	18'inci saat	17β-östradiol 50 µg/sıçan	Uygulama sonrası 18. saat
50µg 17β-östradiol	90'inci saat	17β-östradiol 50 µg/sıçan/gün (3gün)	Son uygulamadan 18 saat sonra
50µg 17β-östradiol	162'nci saat	17β-östradiol 50 µg/sıçan/gün (6gün)	Son uygulamadan 18 saat sonra
100µg 17β-östradiol	18'inci saat	17β-östradiol 100 µg/sıçan	Uygulama sonrası 18. saat
100µg 17β-östradiol	90'inci saat	17β-östradiol 100 µg/sıçan/gün (3 gün)	Son uygulamadan 18 saat sonra
100µg 17β-östradiol	162'nci saat	17β-östradiol 100 µg/sıçan/gün (6gün)	Son uygulamadan 18 saat sonra

Tablo 2: Yöntem içerisinde dokulara uygulanan araştırma protokolü

Table 2: The research protocol applied to the tissues

Uygulama	Uygulama Protokolü	Amaç
İnkübasyon	Bir saat inkübasyona bırakıldı	Ortama uyum
Uygulama I	Elektiriksel Uyarım (EFS)	Submaksimal kasılımın tespiti
Uygulama II	L-Arginin (10 ⁻⁵ M, 10 ⁻⁴ M, 10 ⁻³ M) + EFS	Endojen NO etkisi
	L-NNA (10 ⁻³ M) + L-Arginin (10 ⁻³ M) + EFS	Enzimsel düzeyde endojen NO tespiti
	SNP (10 ⁻⁸ M, 10 ⁻⁷ M, 10 ⁻⁶ M, 10 ⁻⁵ M) + EFS	Eksojen NO etkisi

Tablo 3: Gruplarda 18, 90 ve 162. saat sonunda spontan myometriyal kasılmaların şiddeti ve sıklığı
Table 3: The severity and frequency of spontaneous myometrial contractions at 18, 90, and 162 hours in groups

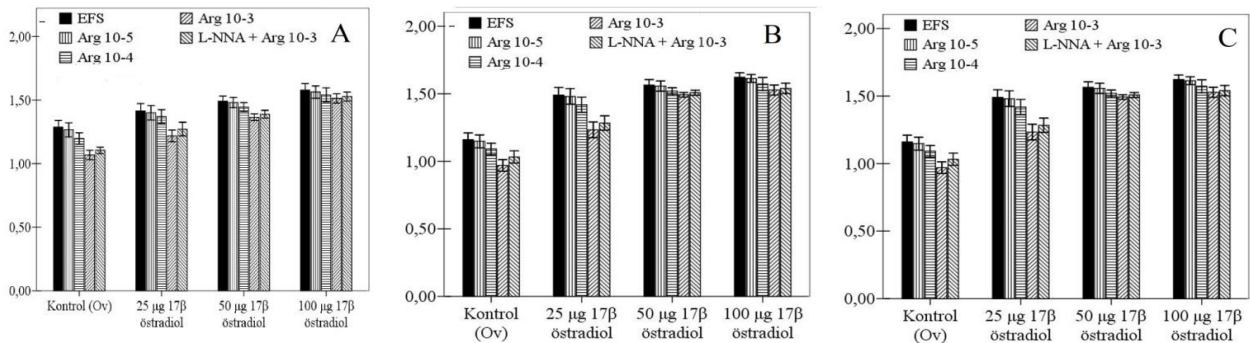
	Kontrol (OV)	25 µg 17β-östradiol	50 µg 17β-östradiol	100 µg 17β-östradiol	P
Kasılım şiddeti (g)					
18. saat	0,95±0,04 ^c	1,06±0,04 ^{bc}	1,18±0,03 ^{ab}	1,26±0,03 ^a	0,000*
90. saat	0,87±0,04 ^c	1,02±0,04 ^b	1,28±0,04 ^a	1,32±0,05 ^a	0,000*
162. saat	0,82±0,04 ^c	1,16±0,05 ^b	1,45±0,05 ^a	1,48±0,04 ^a	0,000*
Kasılım sıklığı (adet/dk)					
18. saat	1,71±0,08 ^a	1,50±0,03 ^b	1,36±0,03 ^{bc}	1,28±0,05 ^c	0,000*
90. saat	1,66±0,07 ^a	1,36±0,04 ^b	1,21±0,04 ^{bc}	1,07±0,06 ^c	0,000*
162. saat	1,79±0,07 ^a	1,13±0,04 ^b	0,98±0,06 ^b	0,77±0,04 ^c	0,000*

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistik olarak fark bulunmuştur. (*): p<0.001

Tablo 4: Gruplarda 18'inci saatte uterus sirküler ve longitudinal kaslarında cGMP-PK1 boyama skor değeri
Table 4: cGMP-PK1 staining scores of uterine circular and longitudinal muscles at 18th hour in groups

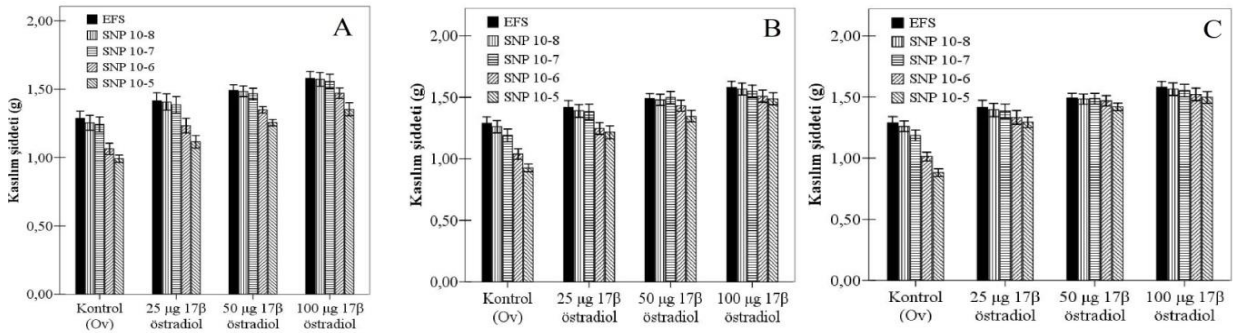
	Kontrol (OV)	25 µg 17β-östradiol	50 µg 17β-östradiol	100 µg 17β-östradiol	P
Sirküler kas					
18. saat	6.50±0.12 ^b	7.41±0.08 ^a	5.25±0.55 ^c	7.75±0.11 ^a	0.00*
90. saat	5.33±1.16 ^{ab}	3.50±0.22 ^b	6.83±0.45 ^a	7.00±0.00 ^a	0.00*
162. saat	7.08±0.08	5.00±1.34	6.66±0.47	5.50±0.56	0.21
Longitudinal					
18. saat	7.33±0.10 ^a	7.41±0.08 ^a	7.00±0.44 ^a	7.75±0.11 ^a	0.21
90. saat	6.58±0.53	6.75±0.11	7.33±0.27	6.50±0.00	0.24
162. saat	7.08±0.08	6.00±0.89	7.25±0.11	6.16±0.73	0.34

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistik olarak fark bulunmuştur. (*): p<0.001



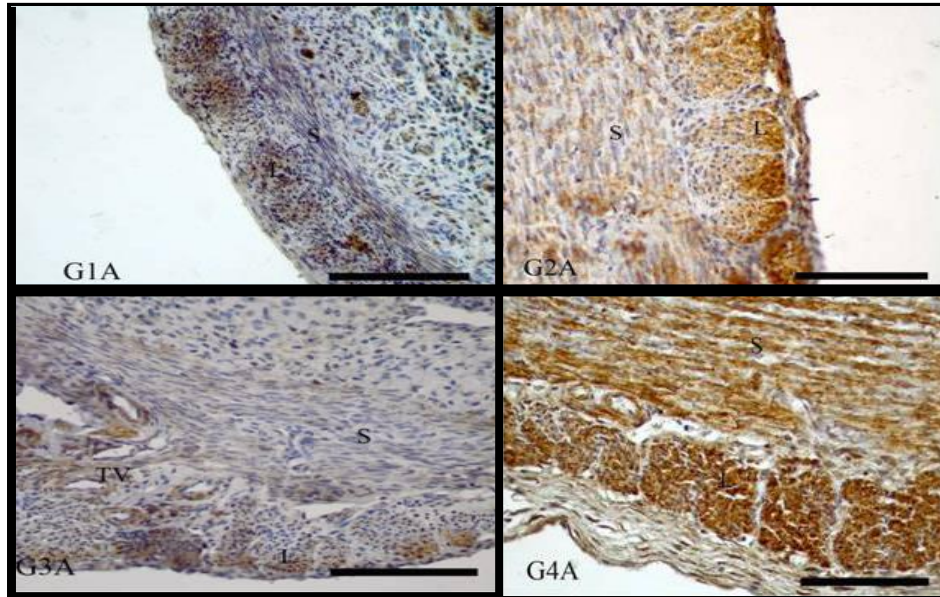
Grafik 1: Gruplarda 18. (A), 90. (B) ve 162. (C) saatlerde uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki L-arginin (10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M, 10⁻³ M) ve NNA (10⁻³ M) + L-Arginin (10⁻³ M) varlığında elektriksel uyarımın oluşturduğu kasılmalara ait amplitüt değerleri ve doz-cevab eğrisi

Graph 1: Amplitude and the dose-response curves of the electrical stimulation for L- arginine (10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M, 10⁻³ M) and NNA (10⁻³ M) + L-Arginine (10⁻³ M) treatments on the uterine smooth muscles at 18 (A), 90 (B) and 162 (C) hours.



Grafik 2: Gruplarda 18. (A), 90. (B) ve 162. (C) saatlerde uterus düz kası üzerine çeşitli konsantrasyonlardaki SNP'nin (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M ve 10^{-5} M) varlığında elektriksel uyarımın oluşturduğu kasılmalara ait amplitüt değerleri ve doz-cevab eğrisi

Graph 2: Amplitude and the dose-response curves of the electrical stimulation for SNP'nin (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M ve 10^{-5} M) treatments on the uterine smooth muscles at 18 (A), 90 (B) and 162 (C) hours



Resim 1. Kontrol (G1A) ve deneme gruplarında (25 µg 17β-östradiol, G2A; 50 µg 17β-östradiol, G3A ve 100 µg 17β-östradiol G4A) 18'inci saatte uterus sirküler (S) ve longitudinal (L) kaslarında cGMP-PK1 dağılımı, bar= 100µm

Figure 1. The cGMP-PK1 distribution in uterus circular (S) and longitudinal (L) muscles at 18th hour in the control (G1A) and experimental groups (25 µg 17β-estradiol, G2A, 50 µg 17β-estradiol, G3A and 100 µg 17β-estradiol G4A), bar = 100µm.

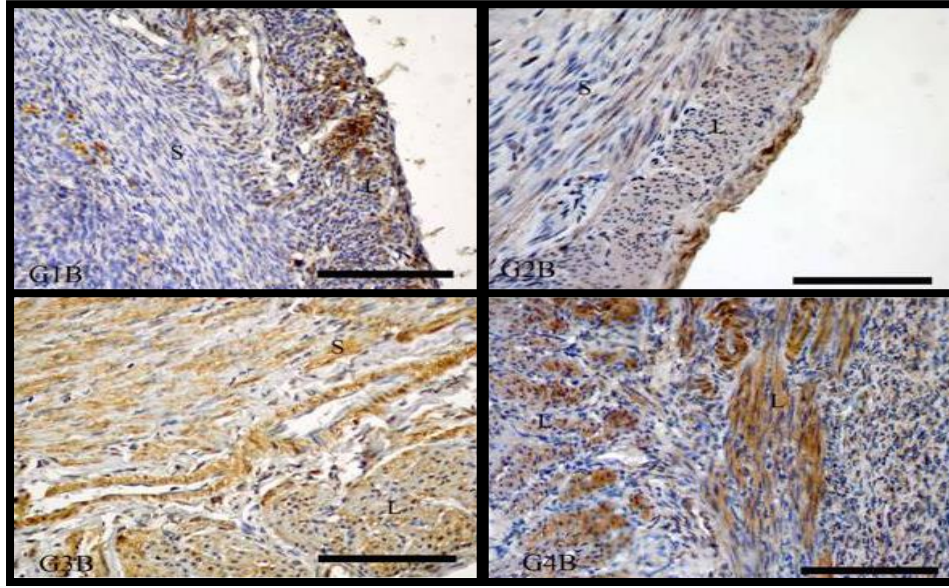
TARTIŞMA

Araştırmada ovaryum steroidlerinden 17β-östradiol'ün doza ve süreye bağlı olarak ratlarda spontan myometrial kasılmalar üzerine olan etkisi incelendi. Myometriyal kasılmalar birçok faktör tarafından düzenlendiği için diğer düz kaslardan farklıdır. Myometriyal kasılmaların etkinliği otonom sinir sisteminin yanı sıra bazı otokoidler özellikle de yerel ve cinsiyet hormonları tarafından düzenlenmektedir (Gart 2001). Ovaryumdan

salgılanan steroid yapıdaki hormonların uterus kasılmaları üzerine doğrudan etkileri bulunmaktadır. Östrus siklusu ve gebelik gibi fizyolojik olaylarda ovaryum steroidlerinin yoğunluğu ve myometriyal kasılmaların özelliği değişmektedir (Weiss 2000). Östrojenlerin myometriyal kasılmaları artırıcı etkisi bilinmektedir (Abramowicz ve Archer 1990; Oike ve ark. 1990; Vedernikov ve ark. 2003; Bulbul 2007b). Bu çalışmada spontan myometriyal kasılmaların şiddetinin 18.saatte 50 ve 100 µg 17β-östradiol

gruplarında, 90 ve 162 saatlerde ise tüm uygulama gruplarında kontrol grubuna göre arttığı görülmüştür ($p<0.001$). Bu bağlamda östrojenlerin

kasılım üzerine etkisinin uygulanan dozuna ve süreye göre değiştiği belirlendi.



Resim 2: Kontrol (G1B) ve deneme gruplarında (25 µg 17β-östradiol, G2B; 50 µg 17β-östradiol, G3B ve 100 µg 17β-östradiol G4B) 90'inci saatte uterus sirküler (S) ve longitudinal (L) kaslarında cGMP-PK1 dağılımı, bar= 100µm

Figure 2. The cGMP-PK1 distribution in uterine circular (S) and longitudinal (L) muscles at 90th hour in the control (G1A) and experimental groups (25 µg 17β-estradiol, G2A, 50 µg 17β-estradiol, G3A and 100 µg 17β-estradiol G4A), bar = 100µm.

Bu araştırmada deneme gruplarında spontan myometriyal kasılım sıklığının kontrol grubuna göre önemli oranda azaldığı gözlemlendi ($p<0,001$). Myometriyumdaki kasılım sıklığı uygulamanın yapıldığı tüm süreler boyunca (18, 90 ve 162. saatler) en yüksek olarak kontrol grubunda bulundu. Kasılım sıklığı 162. saatte en düşük olarak 100 µg 17β-östradiol grubunda görülürken, 18 ve 90. saatlerde 50 ve 100 µg 17β-östradiol gruplarında kasılım sıklıkları arasında fark görülmedi. Bu sonuçlara benzer olarak menopoz sonrası kadınlarda ve Ov ratlarda yapılan çalışmada uterustaki kasılım sıklığının arttığı bildirilmektedir (Vedernikov ve ark. 2003). Ayrıca, sıçanlarda 10 µg/gün 17β-östradiol uygulaması myometriyal kasılım sıklığını Ov grubuna göre azaltmıştır (Bulbul ve ark. 2007b). Araştırmacılar bu artışı Ov ratlarda artan spontan kasılım etkinliğinin ovaryum steroidlerinin genomik ve genomik olmayan baskılayıcı etkilerinin uzaklaştırılmasının myometriyal hücrelerin zarlarının elektriksel kararsızlığa neden olması sonucu olabileceğini bildirmektedirler. Buna ilaveten östrojenlerin düz kaslarda hücre dışına K⁺ çıkışını uyararak hücreyi

hiperpolarize edebildiği, bu sayede spontan kasımların oluşumunu baskıladığı bildirilmiştir (Harder ve Coulson, 1997).

Nitrik oksit endojen olarak L-Argininden NOS enzimleri aracılığı ile oluşmaktadır (Bredt ve Snyder 1990; Forstermann ve ark. 1991). Bir NO prekürsörü olan L-Arginin uygulamasının, insan (Challis ve ark. 2000) ve sıçanda (Bulbul ve ark. 2007) NO sentezini artırdığı ve myometriyal kasımları baskıladığı belirtilmiştir. Fizyolojik koşullarda sıçan serumundaki L-Arginin yoğunluğu yaklaşık 0,2 – 3 mM civarındadır (Langrehr ve ark. 1992). İn vitro ortamdaki düz kasların kasılım etkinliği ise L-Argininin yaklaşık 0.01–1mM yoğunluğunda tamamen ortadan kalkmaktadır (Yallampali ve ark. 1992). Bu araştırmada L-Arginin 0.01 – 1mM yoğunluğunda kullanılmıştır. Gebe insan ve sıçan uterusunda (Izumi ve ark. 1993) ve gebe olmayan insan uterusunda (Hoffmann ve ark. 2003) L-Argininin doza bağımlı olarak kasılım şiddetini azalttığı bildirilmektedir. L-arginin gevşetici etkisinin uterusta doğum anında azaldığı, doğum sonrası 2. günde ise tamamen ortadan

kalktığı ifade edilmektedir (Yallampali ve ark. 1993). Ovaryumları çıkartılmış sıçanlarda L-Arginin uygulaması uterus kaslarında gevşemeye yol açarken, L-Arginin uygulaması 10 gün süre ile 10 µg/gün 17β-östradiol verilen sıçanlarda uterus kası üzerine aynı etkiye yol açmamıştır (Izumi ve ark. 1990). Önceki çalışmalara benzer şekilde bu çalışmada da Ov grubunda L-Argininin doza bağlı olarak uterus kasılım şiddetini azalttığı (p<0.05), 50 ve 100 µg 17β-östradiol gruplarında ise L-argininin dozlarının etkili olmadığı belirlendi. Düşük dozda östrojen uygulanan 25 µg 17β-östradiol grubunda ise L-Argininin gevşetici etkisi 18 ve 90. saatlerde gözlenirken, gevşetici etkinin 162. saatte kaybolduğu görüldü. Yine gruplarda 18, 90. ve 162. saatlerde 10–3 M dozundaki L-Argininin uygulamasının kasılımın % inhibisyonu üzerine etkisi Ov grubunda arterken, bu etki yüksek dozda 17β-östradiol uygulaması (50 ve 100 µg 17β-östradiol) ile azaldı. Ayrıca, 162. saatte L-argininin kasımları azaltıcı etkisi tüm östrojen uygulanan gruplarda baskılanmıştır. Araştırma bulgusu, L-Argininin uterusu oluşturduğu kasılım şiddetini azaltıcı etkisini, östrojenin doza ve süreye bağlı olarak engellediğini düşündürmektedir.

Gebe rat (Yallampali ve ark. 1993), ve gebe olmayan insan uterusunda (Hoffmann ve ark. 2003) yapılan çalışmalarda ekzojen NO kaynaklarından biri olan SNP'nin spontan kasımları tamamen bloke ettiği bildirilmektedir. Benzer şekilde gebelikte SNP'nin spontan myometriyum kasımlarını tamamen ortadan kaldırdığı, fakat KCl ile uyarılmış kasımlarda etkisi olmadığı ifade etmektedir (Lederman ve Rosso, 2004). Oksitosinle uyarılmış uterus kasımları üzerine SNP'nin 10-4 M ve daha düşük dozlarının etkili olmadığı, daha yüksek dozlarının ise toksik etki göstererek dönüşümsüz inhibisyon oluşturduğunu bildirilmektedir (Ann Word ve ark. 1998). Ayrıca SNP uygulamasının Ov sıçanlarda uterusu gevşemeye yol açtığı, fakat bu etkinin 10 gün boyunca 10 µg dozunda 17β-östradiol verilen sıçanlarda ortadan kalktığı gözlenmiştir (Bulbul ve ark. 2007). Yaptığımız bu çalışmada, Ov grubunda 10⁻⁸-10⁻⁵ M aralığında uygulanan SNP'nin doza bağımlı olarak kasılım şiddetini engellediği, 17β-östradiol verilen gruplarda ise dozun ve sürenin artması ile birlikte SNP'nin etkisinin olmadığı görüldü. Argininin gruplardaki etkisine benzer olarak, SNP'nin östrojen gruplarında kasılım şiddetini azaltmaması, 17β-östradiolün SNP'nin uterusu oluşturduğu gevşeme etkisini engellediğini düşündürmektedir. Sodyum nitroprussid uygulamasının uterus düz kasında görülen kasılımın % inhibisyonu üzerine etkisi 17β-östradiolün uygulanma dozuna ve süresine göre değişiklik göstermiştir. Tüm sürelerde en yüksek 17β-östradiol uygulanan grupta SNP'nin kasılımın %

inhibisyonu üzerine etkisi minimum olarak gözlenirken, Ov grubunda % inhibisyon en yüksek düzeyde gerçekleşmiştir. Genel olarak 17β-östradiol uygulaması SNP'nin etkisini baskılamak, 18. saatte en düşük 17β-östradiol uygulanan grup ile Ov grubu arasında benzer bir inhibisyona rastlanmıştır. Bulgularımız SNP'nin uterusu oluşturduğu % kasılım inhibisyonunun östrojenin dozuna ve uygulama süresine bağımlı olduğunu düşündürmektedir.

Bir siklik nükleotid ikincil haberci olan cGMP vücudumuzdaki bir çok dokuda çok farklı olayların oluşmasında rol oynamaktadır. Bu olaylardan bir tanesi de düz kaslarda NO etkisiyle gevşeme sağlamasıdır. Uterusta NO sentezlendiği belirtilmiştir (Buhimschi ve ark. 1995). Nanomolar düzeydeki NO konsantrasyonları guanilil siklazı aktifleyerek cGMP düzeylerini artırmaktadır. Nitrik oksit-cGMP yolunun aktiflenmesi ise bir çok düz kas tipinde gevşemeyle sonuçlanmaktadır. Nitrik oksit-cGMP yolu bu etkisini cGMP-PK1 üzerinden miyozin fosfataz aktivitesini artırarak (Surks ve ark. 1999) veya sitoplazmik Ca²⁺ miktarını azaltarak gerçekleştirmektedir (Cornwell ve ark. 2001). Düz kas gevşemesi kalsiyum regülasyonu ve iyon transportundan sorumlu olan substratların fosforlanması neticesinde oluşmaktadır (Lincoln ve Cornwell 1993). İnsanda NO-cGMP yolunun varlığı uterus düz kaslarında da tespit edilmiştir ve gebelikte oluşabilecek uterus kasılmalarını azaltmak için de farmakolojik olarak kullanılmaktadır (Buhimschi ve ark. 1995). Östrojen enjekte edilen ratlarda cGMP'nin yüksek PK1 düzeylerinde uterus kasında gevşemeye yol açtığından (Word ve Cornwell 1998), NO-cGMP yolunun uterus kasılabilirliğini kontrol etmede önemli olabileceği düşünülmektedir (Cornwell ve ark. 2001).

Bu çalışmada Ov sıçanların endometriyumdaki sirküler ve longitudinal kas hücrelerinde zayıf bir cGMP-PK1 ekspresyonu belirlendi. Özellikle endometriyumun longitudinal kaslarında çeşitli doz ve sürelerde uygulanan 17β-östradiol hormonunun cGMP-PK1 ekspresyonu üzerine etkisi minimum olarak bulundu. Siküler kaslarda ise 18'inci ve 90'ıncı saatlerde cGMP-PK1 ekspresyonu üzerine 17β-östradiolün doza bağımsız bir etkisi görüldü. Bu etki 162'nci saatte tamamen ortadan kalktı. Yukarıda açıklandığı gibi NO tarafından uyarılan myometriyal gevşemenin başka düz kas hücrelerinde olduğu gibi guanilil siklaz ve cGMP üzerinden olduğu düşünülse de (Yallampali ve ark. 1994; Buhimschi ve ark. 1995), değişik çalışmalarda NO'nun uterusu gevşemeyi uyurabilmesi için cGMP ve PK1'nin gerekli olmadığını belirtilmektedir (Kuenzli ve ark. 1998; Buxton ve ark. 2001). Kobay uterus düz kaslarında yapılan çalışmada NO'in guanilil siklazı inhibe eden metilen

mavisi uygulamasına rağmen uterus kaslarında gevşemeye yol açtığı belirtilmiştir (Buxton ve ark. 2001). Buna ilaveten uterus düz kasında herhangi bir gevşeme oluşturabilmek için yüksek düzeylerde (10 µM) cGMP analoglarına ihtiyaç duyulmaktadır (Buxton 2004). Maymun ve insan myometriyumunda NO tarafından oluşturulan uterus gevşemesinin cGMP analogları tarafından oluşturulmadığı, guanilil siklaz-cGMP dışındaki bir yolla gerçekleştiği gözlenmiştir (Kuenzli ve ark. 1998; Buxton ve ark. 2001). Bu çalışmalar NO'nin uterus gevşemesi sağlayabilmesi için cGMP-PK1 artışına ihtiyaç duymadığını, iyon kanalları yoluyla bu etkisini gösterebileceğini düşündürmektedir. Araştırma bulgusunda uterusunda bulunan sirküler ve longitudinal kaslarda 17β-östradiolün tüm dozlarının ve sürelerinin cGMP-PK1 dağılımı üzerine etkisinin düşük olduğu gözlenmiştir.

Siklik GMP'nin NO tarafından gerçekleştirilen bütün olaylarda rol almadığı düşüncesi son yıllarda önem kazanmıştır. Buhimschi ve arkadaşları (2000), sıçan uterusunda gebelikle birlikte NO miktarının artmasına rağmen cGMP düzeylerinde önemli bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada gebe olmayan sıçanlarda uzun süreli östrojen uygulaması uterusdaki NO miktarının artmasına cGMP düzeyinin ise azalmasına sebep olduğu belirtilmiştir. Daha önceki çalışmalar sıçan uterusunda NO'nin uterus kasılmalarını durdurduğunu ve NO seviyelerindeki artışın da cGMP yapımını artırdığını bildirilmektedir (Yallampali ve ark. 1994; Buhimschi ve ark. 1995). Bununla birlikte myometriyumdaki NO etkisinin guanilil siklazdan bağımsız olarak şekillenebilir (Buhimschi ve ark. 2000). Weiner ve arkadaşları (1994) kobaylarda gebeliğin guanilil siklaz seviyesini azalttığını bildirmiştir. Buhimschi ve arkadaşları (2000) da prepübertal sıçanlarda östrojenin guanilil siklazın uterusdaki oluşumunu baskılayabileceğini bildirmişler ve uterusunda cGMP düzeylerindeki değişimlerle NO aktivitesi arasında paralellik kurmanın veya NO aktivitesindeki değişimlerle cGMP düzeylerini bağdaştırmanın yanlış sonuçlar verebileceği kanısına varmışlardır.

Damar düz kasları ile yapılan çalışmalarda damar düz kaslarından elde edilen preparatların, cGMP oluşumu bloklandığı halde, NO uygulaması neticesinde gevşediği görülmüştür (Eckman ve ark. 1994). Bu tür olgular renal arterlerde (Trottier ve ark. 1998), serebral mikrosirkülasyonunda (Pinilla ve ark. 1998) ve nöronal hücre iyon kanallarında da (Ahern ve ark. 1999) rapor edilmiştir. Bu bağlamda myometriyumda NO tarafından gerçekleştirilen gevşemede kalsiyum tarafından aktiflenen potasyum kanallarının (KCa) rol alabileceği önerilmiştir (Mazzone ve ark. 2003). Bu teori KCa kanallarını bloke eden akrep toksinlerinin NO

tarafından oluşturulan gevşemeyi engellemesi ile desteklenmiştir (Buxton ve ark. 2001). Dolayısı ile kalsiyum tarafından aktiflenen potasyum kanallarının KCa kanalları NO'nin myometriyumdaki etkisine aracılık eden faktörlerden olabileceği görülmektedir.

Sonuç olarak; 17β-östradiolün uterus kasılım etkinliğini azaltan L-arginin-NOS-NO yolunun etkinliğini baskıladığı belirlenmiştir. Ayrıca östrojenin uterusunda bulunan longitudinal düz kaslarda cGMP-PK1 ekspresyonu üzerine etkisinin bulunmadığı dolayısı ile myometriyumdaki NO etkisinin cGMP-PK1'den bağımsız olarak şekillenebileceği kanısına varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Yardımlarından dolayı Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ ve Dr. Özlem ÖZDEN AKKAYA'ya teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Abramowicz JS, Archer DF.** Uterine endometrial peristalsis: a trans-vaginal ultrasound study. *Fertil Steril.* 1990; 54: 451-454.
- Ahern GP, Hsu SF, Jackson MB.** Direct actions of nitric oxide on rat neurohypophysial KCa channels. *J Physiol (Lond).* 1999; 520: 165-176.
- Ann Word R, Cornwell LT.** Regulation of cGMP-induced relaxation and cGMP-dependent protein kinase in rat myometrium during pregnancy, *Am J Physiol.* 1998; 43: C748-C756.
- Bredt DS, Snyder SH.** Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme, *Proc Nat Acad Sci USA.* 1990; 87: 682-685.
- Buhimschi IA, Yallampali C, Buhimschi CS, Saade GR, Garfield RE.** Distinct regulation of nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate production by steroid hormones in the rat uterus. *Mol Human Reprod.* 2000; 6: 404-414.
- Buhimschi IA, Yallampali C, Dong YL, Garfield RE.** Involvement of a nitric-oxide guanosine monophosphate pathway in control of human uterine contractility during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1995; 172: 1577-1584.
- Bulbul A, Altunbas K, Sevimli A, Celik HA.** The effects of ovarian steroids on myometrial contractions in ovariectomized rats. *Rev Med Vet.* 2007; 158: 556-561.

- Bülbül A, Bülbül T, Özdemir V, Akosman MS, Ulutaş E, Yılmaz O.** Biphasic effect of nitric oxide on development of ovarian primordial and primary follicles in laying quail. *European Poultry Science*. 2015a; 79-90.
- Bülbül A, Bülbül T, Sevimli A, Yılmaz O.** The effect of dietary supplementation of nitric oxide donor and inhibitor on nNOS expression in and motility of the small intestine of broilers. *Biotechnic & Histochemistry*. 2013; 88(5): 258-266.
- Bulbul A, Yagci A, Altunbas K, Sevimli A, Celik HA, Karadeniz A, Akdağ E.** The role of nitric oxide in the effects of ovarian steroids on spontaneous myometrial contractility in rats. *Theriogenology*. 2007; 68: 1156-1168.
- Bülbül T, Akosman MS, Yılmaz O, Ulutaş E, Bülbül A.** Supplementary dietary nitric oxide donor (sodium nitroprusside) or inhibitor (NG-nitro-L-arginine methyl ester) depressed growth performance and ovarian primordial and primary follicles in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) in a dose-dependent manner. *British Poultry Science*. 2015b; 56(1): 113-120.
- Bülbül T, Özdemir V, Bülbül A, Ulutaş E.** The effect of dietary L-arginine intake on the level of antibody titer, the relative organ weight and colon motility in broilers. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2014; 17(1): 1800-1805., Doi: 10.2478/pjvs-2014-0015.
- Buxton IL.** Regulation of Uterine Function: a Biochemical Conundrum in the Regulation of Smooth Muscle Relaxation. *Mol. Pharmacol*. 2004; 65: 1051-1059.
- Buxton IL, Kaiser RA, Malmquist NA, Tichenor S.** NO-induced relaxation of labouring and non-labouring human myometrium is not mediated by cyclic GMP. *Br J Pharmacol*. 2001; 134: 206-214.
- Challis JRG, Matthews SG, Gibb W, Lye SJ.** Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. 2000; 21: 514-550.
- Cornwell TL, Li J, Sellak H, Miller RT, Word RA.** Reorganization of myofilament proteins and decreased cGMP-dependent protein kinase in the human uterus during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metabol*. 2001; 86: 3981-3988.
- Eckman DM, Weinert JS, Buxton IL, Keef KD.** Cyclic GMP independent relaxation and hyperpolarization with acetylcholine in guinea pig coronary artery. *Br J Pharmacol*. 1994; 111: 1053-1060.
- Forstermann U, Schmidt HHW, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, Murad F.** Isoforms of nitric oxide synthase characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol*. 1991; 42: 1849-1857.
- Gart P.** *Human Pharmacology*, ed: Taylor & Francis, New York. 2001; Pp: 107-109.
- Gordan PL, Jenkins SL, Wentworth RA, Nathanielsz PW.** Effect of in vivo estradiol administration to bilaterally ovariectomized rats on in vitro myometrial responsiveness to prostaglandin F₂alpha and oxytocin. *Biol Repr*. 1977; 57: 597-601.
- Gordon AM, Homsher E, Regnier M.** Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev*. 2000; 80:853-924.
- Harder DR, Coulson PB.** Estrogen receptors and effect of estrogen on membrane electrical properties of coronary vascular smooth muscle. *J Cell Physiol*. 1979; 100: 375-382.
- Hoffmann P, Stanke-Labesque F, Fanchin R, Dilai N, Pons JC, Ayoubi JM.** Effects of L-arginine and sodium nitroprusside on the spontaneous contractility of human non-pregnant uterus. *Hum Reprod*. 2003; 18: 148-151.
- Izumi H, Ichihara J, Uchiumi Y, Shirakawa K.** Gestational changes in mechanical properties of skinned muscle tissues of human myometrium. *Am J Obstet Gynecol*. 1990; 163: 638-647.
- Izumi H, Yallampalli C, Garfield RE.** Gestational changes in L-arginine-induced relaxation of pregnant rat and human myometrial smooth muscle, *Am J Obstet Gynecol*. 1993; 169: 1327-1337.
- Kuenzli KA, Buxton IL, Bradley ME.** Nitric oxide regulation of monkey myometrial contractility. *Br J Pharmacol*. 1998; 124: 63-68.
- Langrehr JM, Dull KE, Ochoa JB, Billiar TR, Ildstad ST, Schraut WH, Simmons RL, Hoffman RA.** Evidence that nitric oxide production by in vivo allosensitized cells inhibits the development of allospecific CTL. *Transplantation*. 1992; 53: 632-640.
- Lederman SA, Rosso P.** Steroid hormone changes in pregnant rats. www.taxtexts.com/SteroidPaper.PDF. 2004; 1-17.

- Lincoln TM, Cornwell TL. (1993) Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J*. 1993; 7: 328-338.
- Mazzone JN, Kaiser RA, Buxton IL.** Calcium-activated potassium channel expression in human myometrium: effect of pregnancy. *Proc West Pharmacol Soc.* 2002; 45: 184-186.
- Misirlioglu D, Nak D, Sevimli A, Nak Y, Ozyigit MO, Akkoc A, Cangul IT.** Steroid receptor expression and HER-2/neu (c-erbB-2) oncoprotein in the uterus of cats with cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2006; 53: 225-229.
- Oike K, Ishihara K, Kikuchi S.** A study on the endometrial movement and serum hormonal level in connection with uterine contraction, *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi.* 1990; 42: 86-92.
- Petrocelli T, Lye SJ.** Regulation of transcripts encoding the myometrial gap junction protein, connexin-43, by estrogen and progesterone. *Endocrinol.* 1993; 133: 284-290.
- Pinilla L, Gonzalez D, Tena-Sempere M, Aguilar E.** Nitric oxide (NO) stimulates gonadotropin secretion in vitro through a calcium-dependent, cGMP independent mechanism. *Neuroendocrinology.* 1998; 68: 180-186.
- Richter ON, Kubler K, Schmolling J, Kupka M, Reinsberg J, Ulrich U, van der Ven H, Wardelmann E, van der Ven K.** Oxytocin receptor gene expression of estrogen-stimulated human myometrium in extracorporeally perfused non-pregnant uteri. *Mol Hum Reprod.* 2004; 10: 339-346.
- Surks HK, Mochizuki N, Kasai Y, Georgescu SP, Tang KM, Ito M, Lincoln TM, Mendelsohn ME.** Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase I β . *Science.* 1999; 286: 1583-1587.
- Trottier G, Triggle CR, O'Neill SK, Loutzenhiser R.** Cyclic GMP-dependent and cyclic GMP-independent actions of nitric oxide on the renal afferent arteriole. *Br J Pharmacol.* 1998; 125: 563-569.
- Vedernikov YP, Hartke JR, Long MA.** Sex hormone effects in non-pregnant rat and human myometrium. *European J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003; 108: 59-66.
- Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S.** Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91: 5212-5216.
- Weiss G.** Endocrinology of parturition, *J Clin Endocrinol Metabol.* 2000; 12: 4421-4425.
- Word RA, Cornwell TL.** Regulation of cGMP-induced relaxation and cGMP-dependent protein kinase in rat myometrium during pregnancy. *Am J Physiol.* 1998; 274: 748-756.
- Yallampali C, Garfield RE, Byam-Smith M.** Nitric oxide inhibits uterine contractility during pregnancy but not during delivery. *Endocrinol.* 1993; 133: 1899-1902.
- Yallampali C, Izumi H, Byam-Smith M, Garfield RE.** An L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate system exists in the uterus and inhibits contractility during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1994; 170: 175-185.

Studies on Tick (*Ixodoidea*) Infestation in Sheep, Goats and Cattle in Afyonkarahisar Region[#]

Mustafa ESER^{1*}, Hatice ÇİÇEK²

¹Anadolu University, Open Education Faculty, Health Programs Department, Yunusemre Campus, Tepebaşı, Eskişehir
²Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Parasitology, A.N.S. Campus, Afyonkarahisar

[#]This article has been summarized from a doctoral dissertation (2012/007) supported by Afyon Kocatepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (07-VF-01) and accepted by Afyon Kocatepe University Institute of Health Sciences and was presented as a poster in the 18th National Parasitology Congress (Denizli-2013).

*Corresponding author e-mail: meser961@anadolu.edu.tr

ABSTRACT

This study was carried out between May 2008 and April 2010 in the provinces of Şuhut, İscehisar, İhsaniye and Hocalar in order to determine the prevalence and seasonal activities of tick species in sheep, goat and cattle in Afyonkarahisar region. During the study, 1920 sheep, 1920 goats and 1920 cattle were examined for tick and developmental stages. 669 (34.84%) of the cows, 608 (31.66%) of the goats and 348 (18.12%) of the cattle were infested with different species of ticks. In Afyonkarahisar, tick infestation was determined as 28.21% in sheep, goat and cattle. During the study, 13660 ticks were collected from sheep, goats and cattle in Afyonkarahisar region. These were *Rhipicephalus bursa* (29.96 %), *R. sanguineus* (17.23 %), *Haemaphysalis parva* (16.88 %), *Dermacentor niveus* (15.09 %), *R. turanicus* (6.43 %), *Hyalomma marginatum* (4.93 %), *Hae. sulcata* (2.92 %), *Hae. punctata* (1.71 %), *D. marginatus* (0.46 %), *H. detritum* (0.2 %), *H. anatolicum* (0.09 %), *H. excavatum* (0.06 %), *Ornithodoros laborensis* (2.35 %), *Ornithodoros spp.* nymph (1.09 %), *Ornithodoros spp.* larvae (0.05 %), *Rhipicephalus spp.* nymph (0.31 %), *Rhipicephalus spp.* larvae (0.04 %), *Haemaphysalis spp.* nymph (0.20 %) respectively.

Keywords: Afyonkarahisar, Sheep, Goats, Cattle, Tick.

Afyonkarahisar Yöresindeki Koyun, Keçi ve Sığırlarda Kene (*Ixodoidea*) İnfestasyonu Üzerine Araştırmalar

ÖZ

Bu çalışma, Mayıs 2008-Nisan 2010 tarihleri arasında, Afyonkarahisar yöresindeki koyun, keçi ve sığırlarda bulunan kene türlerinin yaygınlıklarını ve mevsimsel aktivitelerini belirlemek amacıyla Şuhut, İscehisar, İhsaniye ve Hocalar ilçelerinde yürütülmüştür. Çalışma süresince 1920 koyun, 1920 keçi ve 1920 sığır keneler ve gelişim dönemleri yönünden muayene edilmiştir. Koyunların 669 (% 34.84)'u, keçilerin 608 (% 31.66)'i, sığırların 348 (% 18.12)'i farklı kene türleri ile infeste bulunmuştur. Afyonkarahisar'daki koyun, keçi ve sığırlarda kene infestasyonu % 28.21 olarak belirlenmiştir. Koyun, keçi ve sığırlar üzerinden 13660 kene toplanmış, bunların % 29.96'sı *Rhipicephalus bursa*, % 17.23'ü *R. sanguineus*, % 16.88'i *Haemaphysalis parva*, % 15.09'u *Dermacentor niveus*, % 6.43'ü *R. turanicus*, % 4.93'ü *Hyalomma marginatum*, % 2.92'si *Hae. sulcata*, % 2.35'i *Ornithodoros laborensis*, % 1.71'i *Hae. punctata*, % 0.46'sı *D. marginatus*, % 0.31'i *Rhipicephalus spp.* nimf, % 0.20'si *H. detritum*, % 0.20'si *Haemaphysalis spp.* nimfi, % 0.09'u *H. anatolicum*, % 0.06'sı *H. excavatum*, % 0.04'ü *Rhipicephalus spp.* larva, % 1.09'u *Ornithodoros spp.* nimf, % 0.05'i *Ornithodoros spp.* larva, olarak teşhis edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Afyonkarahisar, Koyun, Keçi, Sığır, Kene.

To cite this article: Eser M, Çiçek H. Studies on Tick (*Ixodoidea*) Infestation in Sheep, Goats and Cattle in Afyonkarahisar Region. Kocatepe Vet J. (2018) 11(4): 385-393.

INTRODUCTION

Ticks are one of the most important ectoparasites that threaten animal and human health by either sucking blood themselves or as a mechanical or biological carrier of many viral, bacterial, rickettsial, spiroketal, protozoa and helminth disease agents, both in the tropical and subtropical climates (Uilenberg, 1995; Karaer et al., 1997; Jongejan and Uilenberg, 2004; Byford and Craig, 2007; Dantas-Torres, 2008, İnci et al., 2016). In the world, a total of 907 tick species have been reported from Ixodidae (720), Argasidae (186) and Nuttalliellidae (1) families (Horak et al., 2002; Barker and Murrell, 2004, Dumanli et al., 2012). Turkey is a country where ticks can dwell in and continue their biological activities thanks to the climate, topography and vegetation (Karaer et al., 1997, İnci et al., 2016). This study was carried out to determine the distribution of tick species and their seasonal activities in the sheep, goats and cattle in Afyonkarahisar region.

MATERIAL and METHOD

This study was carried out between May 2008 and April 2010 in Suhut, Iscehisar, Ihsaniye and Hocalar districts of Afyonkarahisar where the vegetation, land structure, temperature, precipitation and humidity show differences and the the animal population is dense. During the course of the study, each research unit was regularly visited once a month for 24 months. In this research centers, tick species were investigated in cattle, sheep, goats and their shelters. In all districts, pasture grazing and untreated flocks of all host species were examined for ticks. The number of animals examined was determined as 20 pieces from each destination and animal species. The ticks collected from animals were seperately placed in tubes with perforated lids. The information such as the district from which the ticks were collected, date and host species was written on the tubes.

Besides, white sheets were circulated across the pastures to collect ticks in different developmental stages. The ectoparasites collected in this way were taken in small bottles containing 70% alcohol. The ticks collected in accordance with the technique and brought in to the laboratory alive were cleaned out with thin bristles. Fed nymphs were taken in incubation (28 °C and 95% relative humidity) to molt in order to be able to diagnose the species in hungry mature condition. Under stereomicroscope, nymphs and larvae not having molted were diagnosed on the basis of family while adults were classified on the basis of species according to the keys provided by Kurtçınar (1954), Merdivenci (1969), Karaer et al. (1997), and Estrada-Pena et al. (2004). Mean precipitation, relative humidity and temperature data of Afyonkarahisar were obtained from the General Directorate of Meteorology. The evaluation of the field data was done using frequency, percentage distribution and correlation analysis in SPSS package program. Ethics committee approval was not obtained because the study material was formed by ticks.

FINDINGS

In the study, 1920 sheep, 1920 goats and 1920 cattle were tested for tick infestation. 669 (34.84 %) of sheep, 608 (31.66 %) of goats, 348 (18.12 %) of cattle were found to be infested with ticks.

The rates of tick infestation diagnosed in sheep, goats and cattle according to seasons during the study have been given in Table 1. During the two-year study period, the animals with the highest infestation rate were identified as sheep, goats and cattle, respectively. In animals, infestation was most commonly seen during the summer and at least during the winter months. It was observed that in the spring season, the animals were more infested than the autumn and less than the summer months. On a seasonal scale, the highest infestation in animals was seen in summer, spring, autumn and winter, respectively.

Table 1. Infestation rates of various ticks in sheep, goats and cattle in Afyonkarahisar region

Seasons	Infestation Rate (%)			
	Sheep	Goat	Cattle	Total
Autumn	37,29 (179/480)*	33,75 (162/480)	19,16 (92/480)	30,06(433/1440)
Winter	19,16 (92/480)	20 (96/480)	5,8 (28/480)	15(216/1440)
Spring	36,16 (188/480)	34,79 (167/480)	23,54 (113/480)	32,5(468/1440)
Summer	43,75 (210/480)	38,12 (183/480)	23,95 (115/480)	35,2(508/1440)
Mean	34,84 (669/1920)	31,66 (608/1920)	18,12 (348/1920)	28,21(1625/5760)

*The number of infested animals/ The number of examined animals

In Afyonkarahisar region 13 tick species residing five families of sheep, goat and cattle were detected. 11 species in the sheep and cattle and 10

species in goats were found. From the collected ticks, *Rhipicephalus bursa*, *R. sanguineus*, *R. turanicus*,

Hyalomma marginatum, *H. detritum*, *Dermacentor niveus*, *D. marginatus* and *Haemaphysalis parva* *Hae. punctata* were found in three animal species. Adults, larvae and nymphs of *Ornithodoros laborensis* were only seen in the sheep, the species of *H. excavatum* and *H. anatolicum* were detected only in the cattle, and the nymph of *Haemaphysalis spp.* were observed only in the goats. The nymphs of *Hae. sulcata* and *Rhipicephalus spp.* were observed in the sheep and goats. In the grazing areas, mature *D. niveus* was found only in Hocalar while *O. laborensis* was observed in sheep barn in Iscehisar.

The distribution of ticks collected from the sheep for two years according to research centers was shown in Table 2. During the study, 7347 tick species were collected from the sheep. The rates of these were as 25.21% *R. bursa*, 20.7% *R. sanguineus*, 20.35% *Hae. parva*, 12.58% *D. niveus*, 9.77% *R. turanicus*, 3.04% *Hae. sulcata*, 1.31% *Hae. punctata*, 0.38% *D. marginatus*, 0.15% *H. marginatum*, 0.03% *H. detritum*, 4.36% *O. laborensis*, 0.01% *Rhipicephalus spp. nymph*, 2.03% *Ornithodoros spp. nymph*, 0.1% *Ornithodoros spp. larvae*.

Table 2. The distribution of ticks collected from the sheep according to the research centers

Tick Species		Research Center				Total	%
		Suhut	Iscehisar	Ihsaniye	Hocalar		
<i>R. bursa</i>	Male	162	211	509	137	1019	13,87
	Female	136	140	443	114	833	11,34
<i>R. sanguineus</i>	Male	48	87	653	215	1003	13,65
	Female	56	58	297	106	517	7,04
<i>R. turanicus</i>	Male	15	91	251	94	451	6,14
	Female	13	84	111	59	267	3,63
<i>H. marginatum</i>	Male	0	5	4	1	10	0,14
	Female	1	0	0	0	1	0,01
<i>H. detritum</i>	Male	2	0	0	0	2	0,03
	Female	0	0	0	0	0	0,00
<i>D. niveus</i>	Male	215	124	87	118	544	7,40
	Female	153	78	84	65	380	5,17
<i>D. marginatus</i>	Male	9	5	1	4	19	0,26
	Female	6	2	1	0	9	0,12
<i>Hae. parva</i>	Male	496	270	71	111	948	12,90
	Female	286	142	34	85	547	7,45
<i>Hae. sulcata</i>	Male	77	4	20	6	107	1,46
	Female	81	4	28	3	116	1,58
<i>Hae. punctata</i>	Male	29	19	4	10	62	0,84
	Female	14	15	2	3	34	0,46
<i>Rhipicephalus spp.</i>	Nymph	0	0	1	0	1	0,01
<i>Ornithodoros laborensis</i>	Male	0	245	0	0	245	3,33
	Female	0	76	0	0	76	1,03
<i>Ornithodoros spp.</i>	Larvae	0	7	0	0	7	0,10
	Nymph	0	149	0	0	149	2,03
Total		1799	1816	2601	1131	7347	100

The distribution of the ticks collected from the sheep according to the months was given in Table 3. According to that, the highest number of ticks on the sheep was found in May, followed by June and April. The infestation was at least in August. During the course of two years of study, the tick species causing the most infestation in the sheep was *Rhipicephalus bursa* while *Hyalomma detritum* was

the rarest. The ticks from *Rhipicephalus spp.* and *Hyalomma spp.* families were observed in spring and summer times (April-August) while the ticks from *Dermacentor spp.* and *Haemaphysalis spp.* families, being present mostly in autumn and winter times (September- February), reduced in number in spring and totally disappeared in summer months. Mature *Ornithodoros laborensis* and larvae and nymphs of *Ornithodoros spp.* were encountered in November and January.

Table 3. The distribution of the ticks collected from the sheep according to the months

Tick Species	Months												Total
	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	I	II	III	IV	
<i>R. bursa</i>	637	566	76	16	6	0	0	0	0	0	0	551	1852
<i>R. sanguineus</i>	505	645	172	24	0	0	0	0	0	0	0	174	1520
<i>R. turanicus</i>	277	204	34	5	0	0	0	0	0	0	0	198	718
<i>H. marginatum</i>	5	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11
<i>H. detritum</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>D. niveus</i>	9	0	0	0	441	115	80	78	101	46	37	17	924
<i>D. marginatus</i>	1	0	0	0	8	1	5	2	1	1	6	3	28
<i>Hae. parva</i>	4	0	0	0	305	288	260	178	278	97	65	20	1495
<i>Hae. sulcata</i>	1	0	0	0	99	81	14	17	5	3	3	0	223
<i>Hae. punctata</i>	0	0	0	0	10	27	24	13	21	0	1	0	96
<i>Ornithodoros laborensis</i>	0	0	0	0	0	0	186	0	135	0	0	0	321
<i>Ornithodoros spp. larvae</i>	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	7
<i>Ornithodoros spp. nymph</i>	0	0	0	0	0	0	111	0	38	0	0	0	149
<i>Rhipicephalus spp. nymph</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Total	1441	1422	282	45	869	512	687	288	579	147	112	963	7347

The distribution of the ticks collected from the goats for two years according to the research centers were given in Table 4. During the course of the study, 4094 tick species were collected from the goats. The rates of these were as 44.14% *R. bursa*, 20.86% *D. niveus*, 15.12% *Hae. parva*, 5.62% *R.*

sanguineus, 4.3% *Hae. sulcata*, 3.27 % *Hae. punctata*, 2.52 % *R. turanicus*, 1.89 % *H. marginatum*, 0.46 % *D. marginatus*, 0.02 % *H. detritum*, 1% *Rhipicephalus spp. nymph*, 0.68 % *Haemaphysalis spp. nymph*, 0.12 % *Rhipicephalus spp. larvae*.

Table 4. The distribution of the ticks collected from the goats for two years according to the research centers

Tick Species		Research Center				Total	%
		Suhut	Iscehisar	Ihsaniye	Hocalar		
<i>R. bursa</i>	Male	226	353	555	48	1182	28,87
	Female	118	236	233	38	625	15,27
<i>R. sanguineus</i>	Male	16	15	87	22	140	3,42
	Female	11	6	54	19	90	2,20
<i>R. turanicus</i>	Male	12	19	13	16	60	1,47
	Female	6	17	9	11	43	1,05
<i>H. marginatum</i>	Male	15	15	8	13	51	1,25
	Female	5	10	6	5	26	0,64
<i>H. detritum</i>	Male	0	0	0	1	1	0,02
	Female	0	0	0	0	0	0,00
<i>D. niveus</i>	Male	130	75	95	260	560	13,68
	Female	117	55	55	67	294	7,18
<i>D. marginatus</i>	Male	6	2	0	8	16	0,39
	Female	0	1	0	2	3	0,07
<i>Hae. parva</i>	Male	132	79	56	88	355	8,67
	Female	100	52	46	66	264	6,45
<i>Hae. sulcata</i>	Male	44	8	21	30	103	2,52
	Female	24	17	16	16	73	1,78
<i>Hae. punctata</i>	Male	20	29	7	35	91	2,22
	Female	12	14	3	14	43	1,05
<i>Rhipicephalus spp.</i>	Larvae	0	5	0	0	5	0,12
	Nymph	0	41	0	0	41	1,00
<i>Haemaphysalis spp.</i>	Nymph	0	0	0	28	28	0,68
Total		994	1049	1264	787	4094	100

The distribution of the ticks collected from the goats for two years according to the months were given in Table 5. According to that, the highest number of ticks on goats was found in June followed by September and April. The least of infestation was found in August. During the two years of the study, the tick species causing the

highest and lowest rate of infestation were *Rhipicephalus bursa* and *Hyalomma detritum*, respectively. The nymphs and larvae of *Rhipicephalus spp.* were seen in November. The nymphs of *Haemaphysalis spp.* were seen only in the goats and in October.

Table 5. The distribution of the ticks collected from the goats from Afyonkarahisar region according to the months

Tick Species	Months												Total
	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	I	II	III	IV	
<i>R. bursa</i>	325	945	250	24	4	0	3	0	0	0	0	256	1807
<i>R. sanguineus</i>	1	70	31	0	0	0	0	0	0	0	0	128	230
<i>R. turanicus</i>	10	9	27	6	0	0	0	0	0	0	0	51	103
<i>H. marginatum</i>	18	6	5	0	2	0	0	0	0	0	0	46	77
<i>H. detritum</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>D. niveus</i>	12	0	0	0	451	203	74	24	18	20	43	9	854
<i>D. marginatus</i>	2	0	0	0	1	5	1	0	2	2	5	1	19
<i>Hae. parva</i>	0	0	0	0	158	212	91	61	35	28	14	20	619
<i>Hae. sulcata</i>	0	0	0	0	36	23	69	17	12	4	6	9	176
<i>Hae. punctata</i>	0	0	0	0	8	6	69	28	6	6	8	3	134
<i>Rhipicephalus spp.</i> larvae	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5
<i>Rhipicephalus spp.</i> nymph	0	0	0	0	0	0	41	0	0	0	0	0	41
<i>Haemaphysalis spp.</i> nymph	0	0	0	0	0	28	0	0	0	0	0	0	28
Total	368	1031	313	30	660	477	353	130	73	60	76	523	4094

The distribution of the ticks collected from the cattle from Afyonkarahisar region during the two years of study according to the research centers was shown in Table 6. During the study, 2219 tick species were collected. The rates of these were as

27.17% *R. sanguineus*, 26.36% *H. marginatum*, 19.51% *R. bursa*, 12.76% *D. niveus*, 8.65% *Hae. parva*, 2.61% *R. turanicus*, 1.13% *H. detritum*, 0.72% *D. marginatus*, 0.54 % *H. anatolicum*, 0.37% *H. excavatum*, 0.18% *Hae. punctata*.

Table 6. The distribution of the ticks collected from the cattle from Afyonkarahisar region according to the research centers

Tick Species		Research Center				Total	%
		Suhut	Iscehisar	Ihsaniye	Hocalar		
<i>R. bursa</i>	Male	14	58	51	21	144	6,49
	Female	18	52	42	177	289	13,02
<i>R. sanguineus</i>	Male	7	7	94	208	316	14,24
	Female	4	9	95	179	287	12,93
<i>R. turanicus</i>	Male	0	22	14	0	36	1,62
	Female	0	19	2	1	22	0,99
<i>H. marginatum</i>	Male	128	49	89	108	374	16,85
	Female	57	41	51	62	211	9,51
<i>H. detritum</i>	Male	7	2	5	3	17	0,77
	Female	2	2	3	1	8	0,36
<i>H. excavatum</i>	Male	6	0	1	0	7	0,32
	Female	0	0	1	0	1	0,05
<i>H. anatolicum</i>	Male	0	2	2	2	6	0,27
	Female	0	2	4	0	6	0,27
<i>D. niveus</i>	Male	52	29	29	51	161	7,26
	Female	49	31	20	22	122	5,50
<i>D. marginatus</i>	Male	4	0	2	4	10	0,45
	Female	4	0	2	0	6	0,27
<i>Hae. parva</i>	Male	10	46	13	75	144	6,49
	Female	11	31	4	2	48	2,16
<i>Hae. punctata</i>	Male	0	2	0	0	2	0,09
	Female	0	2	0	0	2	0,09
Total		373	406	524	916	2219	100

The distribution of the ticks collected from the cattle during the two years of study according to the months was shown in Table 7. The highest frequency of ticks on the cattle was seen in May, followed by June and April. While no tick was encountered in March, minimal infestation was

detected in January. During the two years of research, the most infestation in cattle was caused by *Rhipicephalus sanguineus* and *H. marginatum* whereas *Hae. punctata* was the least prominent species.

Table 7. The distribution of the ticks collected from the cattle from Afyonkarahisar region according to months

Tick Species	Months												Total
	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	I	II	III	IV	
<i>R. bursa</i>	263	54	8	5	0	0	0	0	0	0	0	103	433
<i>R. sanguineus</i>	331	230	5	0	0	0	0	0	0	0	0	37	603
<i>R. turanicus</i>	1	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	48	58
<i>H. marginatum</i>	207	266	39	9	17	1	0	0	0	1	0	45	585
<i>H. detritum</i>	6	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	14	25
<i>H. excavatum</i>	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
<i>H. anatolicum</i>	4	4	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	12
<i>D. niveus</i>	0	0	0	0	109	109	41	4	4	13	0	3	283
<i>D. marginatus</i>	0	0	2	0	9	2	2	0	1	0	0	0	16
<i>Hae. parva</i>	0	0	0	0	12	31	39	81	4	18	0	7	192
<i>Hae. punctata</i>	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	4
Total	820	566	54	20	147	143	86	85	9	32	0	257	2219

During the research, the distribution of the ticks on the host body parts was also determined. According to that, the mature ones of *Rhipicephalus bursa*, *R. sanguineus* and *R. turanicus* were detected in the ears of the sheep, inguinal regions of the cattle more frequently than in the other parts. The mature ones of *R. bursa* were more in perianal regions and the mature ones of *R. sanguineus* and *R. turanicus* were in the ears of the goats. Larvae and nymphs of *Rhipicephalus spp.* were on the backs of the sheep and goats. Mature *Hyalomma marginatum* was more frequently in the inguinal regions of the sheep, in inguinal and perianal regions of the cattle and goats, and also the mature *H. detritum*, *H. excavatum* and *H. anatolicum* were mostly in the inguinal regions of the cattle. Mature ones of *Dermacentor niveus* were more commonly seen in the chests of goats and tails of the sheep and cattle. Mature ones of *Dermacentor marginatus* were more frequently seen in the tails and chests of goats and in the tails of the sheep and cattle than any other parts. The mature ones of *Haemaphysalis parva* were detected in the ears of the cattle and the chests of the sheep and goats. The mature ones of *Hae. sulcata* and *Hae. punctata* were seen more in the chests of the sheep and goats than in the other parts. The nymphs of *Haemaphysalis spp.* were detected on the backs of the goats. The mature ones of *Ornithodoros laborensis* and the larvae and nymphs of *Ornithodoros spp.* were observed on the backs of the sheep.

In the research, a significant linear relationship was not found between the numbers of *R. bursa*, *R. sanguineus*, *R. turanicus*, *Rhipicephalus spp.* nymph, *H. marginatum*, *H. detritum*, *H. excavatum*, *D. marginatus*, *D. niveus*, *Hae. sulcata*, *Haemaphysalis spp.* larvae and nymph, *O. laborensis*, *Ornithodoros spp.* larvae and nymph and mean precipitation, mean temperatures and mean humidity measures ($p > 0.05$). A negative relation was determined between the numbers of mature *Hyalomma anatolicum* and mean humidity measures ($p \leq 0.05$). As the humidity increased, the number of *H. anatolicum* decreased. A significant linear relation was not found between the numbers of mature *Hyalomma anatolicum* and mean precipitation and temperature measures ($p > 0.05$). A positive relation was determined between the numbers of the mature *Haemaphysalis parva* and mean humidity measures ($p \leq 0.05$). As the humidity increased, the number of the mature *Hae. parva* increased. A significant linear relationship was not found between mean precipitation and mean temperature measures and the number of mature *Hae. parva* ($p > 0.05$). A positive relationship was determined between the number of mature *Haemaphysalis punctata* and mean humidity measures ($p \leq 0.05$). As the mean humidity rose, the number of mature *Hae. punctata* increased. A significant linear relationship was not determined between the mean precipitation and mean temperature measures and the number of the mature ones of the species ($p > 0.05$).

DISCUSSION

In the studies conducted in Turkey to date, 32 tick species have been determined in the sheep, goats, and cattle (Kurtpınar 1954; Oytun, 1956; Merdivenci, 1969; Aydın and Bakırcı, 2007; Dumanlı et al., 2012). In this study conducted in Afyonkarahisar, 13 species such as *Rhipicephalus bursa*, *R. sanguineus*, *R. turanicus*, *Hyalomma marginatum*, *H. detritum*, *H. anatolicum*, *H. excavatum*, *Dermacentor niveus*, *D. marginatus*, *Haemaphysalis parva*, *Hae. punctata*, *Hae. sulcata* and *Ornithodoros laborensis* were found in the sheep, goats, and cattle.

In the study, *Rhipicephalus bursa* was found in all research centers. When listed according to the frequency rates in the animal species, it was mostly seen in the sheep, goats and the cattle, respectively. It was maximal in April-June and minimal in July-August. This is compatible with the findings of other studies (Karaer, 1983; Zeybek and Kalkan, 1984; Taşçı, 1989; Arslan et al., 1999; Aktaş et al., 2006; Mamak et al., 2006; İça and Özkan, 2015). Compared to the other *Rhipicephalus* species, it is the most frequently encountered species. While this is similar to the findings of some studies (Sayın and Dumanlı, 1982; Taşçı, 1989; Aydın, 1994; Razmi et al., 2007), also presents differences with some others (Yukarı and Umur, 2002; İça and Özkan, 2015).

The ticks of *Rhipicephalus sanguineus* species were observed in all research centers. It was seen in April-August in the sheep and in April-July in the cattle and goats. When all research centers were considered, it was mostly seen in June and minimally in July. This is compatible with other previous studies (Taşçı, 1989; Beyazıt, 2000).

Rhipicephalus turanicus was most frequently collected from the sheep and most densely in May. The least number was collected from the cattle. It was most densely collected from the cattle and goats in April. While this species among *Rhipicephalus* species was reported to be the most dominant in Burdur (Yukarı and Umur, 2002), Kütahya (İça and Özkan, 2015), Van Region (Taşçı, 1989) and Black Sea Region (Aydın et al., 2012), it was the least detected species in our study.

Species from *Hyalomma* family were most and least commonly seen in the cattle and in the sheep, respectively. When listed according to density, *H. marginatum*, *H. detritum* and *H. anatolicum* and *H. excavatum* species of ticks were diagnosed. It was reported that the ticks from that family were observed on the cattle in Manisa, İzmir and Aydın provinces throughout the year but their numbers

were limited during the winter months (Bakırcı et al., 2012). During the research, the ticks from that family were observed between April and July and most commonly seen in June.

The ticks from *Dermacentor* family were mostly reported in goats and minimally observed in the cattle in Burdur region (Yukarı and Umur, 2002). In the study carried out in Kütahya region (İça and Özkan, 2015), *D. marginatus* was reported to have been commonly seen only in the sheep. In our study, *Dermacentor niveus* and *D. marginatus* were seen in all animal species, mostly in the sheep and minimally in the cattle, frequently in autumn months.

In our study, from *Haemaphysalis* family, *Haemaphysalis parva*, *Hae. sulcata* and *Hae. punctata* species were observed. When three species were compared, mostly *Hae. parva* and minimally *Hae. punctata* were detected. All three species were observed between September and April. It was reported to have been seen in the sheep and goats in Samsun region in August, September, November and December (Zeybek, 1980). It was reported that all three species were observed in the Northern Marmara Region, Balıkesir, Bilecik, Bursa and Çanakkale provinces during autumn and winter months (Aydın, 2002). In our study, in the cattle, *Hae. parva* and a small number of *Hae. punctata* were detected. *Haemaphysalis* species were reported to be on the animals in Van and Gevaş, Muradiye, Erciş, Özalp and Saray districts during autumn, winter and spring times (Akdemir, 2001). The data on these species derived from our study are compatible with the results of that study. It was reported that in Ankara region, *Hae. parva* and *Hae. punctata* were intensely observed on the cattle, sheep and goats in March and October while *Hae. sulcata* were at high levels in March and November (Cicek, 2004). In our study, ticks of *Hae. sulcata* were not found on the cattle.

In the study conducted on the cattle and sheep in Kayseri region it was reported that ticks of *Ornithodoros laborensis* species were only seen in the sheep (Yay et al., 2004), encountered in the cattle and sheep in Elazığ (Sayın and Dumanlı, 1982), and were not found in the Northern Marmara Region (Aydın, 1992). During the research, the ticks of *O. laborensis* were detected only in the sheep in November and January. They were not found in other animal species.

Ixodes ricinus, *Ixodes hexagonus* species from Ixodes family were reported in Turkey. *I. ricinus* was mostly reported in the forestland and coastal regions (Gargılı et al., 2010). In addition, previous studies

have reported that such species are more frequent in high regions with low altitude and relative intensity (Er, 1996). İça and Özkan (2015) reported that they found these two tick species in high altitude forestland in Kütahya region. In this study, no ticks from that family was found in any animal species.

Boophilus (Rhipicephalus) annulatus has been reported to reside on animals mostly in spring and autumn months (Hoofman et al., 1971). It has been reported to appear in the cattle in Burdur region in the months other than February, March, and August (Yukarı and Umur, 2002), in the cattle and sheep in Elazığ region mostly in spring (Sayın and Dumanlı, 1982), that it is the most frequent species in the cattle in the Northern Marmara region and the least frequent one in sheep and goats (Aydın, 1994), that it is seen in the cattle more commonly than in the sheep and goats in Kütahya region (İça and Özkan, 2015). During our research, *Boophilus (Rhipicephalus) annulatus* was not seen in any animal species. It has been considered that the insecticide regularly applied to the cattle within the scope of the combat put up against ticks by the Ministry of Food, Agriculture and Livestock during the years of the study, and that this species is overly susceptible to the cold weather might have resulted in not encountering this species.

RESULT

In Afyonkarahisar region, 13 tick species such as *Rhipicephalus bursa*, *R. sanguineus*, *R. turanicus*, *Haemaphysalis parva*, *Hae. sulcata*, *Hae. punctata*, *Dermacentor niveus*, *D. marginatus*, *Hyalomma marginatum*, *H. detritum*, *H. anatolicum*, *H. excavatum*, *Ornithodoros laborensis* were collected from the sheep, goats and cattle. The mature ones of *Rhipicephalus bursa* were extensively detected in areas where the terrestrial climate is dominant, with steppe vegetation and calcareous soil structure. The occurrence of *Rhipicephalus sanguineus* were more common in the regions where the Mediterranean climate is dominant and covered with scrubs and rugged terrain. Mature *Rhipicephalus turanicus* was seen in the areas where vegetation is richer in steppe and forestland. The mature ones of *Hyalomma marginatum* were commonly seen in the regions covered with scrubs where the terrestrial climate is dominant, and the mature ones of *H. detritum* and *H. excavatum* were extensively present in the regions with the terrestrial climate. Mature ones of *Dermacentor niveus* and *D. marginatus* were most commonly observed in high altitude regions with rich scrubs and forestland. The mature ones of *Haemaphysalis parva* and *H. sulcata* were more frequently observed in the high altitude regions where the vegetation is poor but the terrestrial

climate is softer. In the study, the mature ones of *Haemaphysalis punctata* were less frequently found in the regions with steppes than other *Haemaphysalis* species.

In Afyonkarahisar region, tick infestation was highest in sheep (34.84%), in goats (31.66%) and in cattle (18.12%), respectively. *Haemaphysalis spp.* nymph and larvae were found in goats, *Rhipicephalus spp.* nymphs were found in the sheep and goats, and larvae were only found in the goats during the study. In order for an effective combat against the ticks, the seasonal activities of the species must be known. Therefore, the seasonal activities of ticks in all regions must be determined.

REFERENCES

- Akdemir C.** Van yöresi koyunlarında bulunan kene türlerinin (fam: ixodidae) tespiti ve epidemiyolojisi üzerine araştırmalar. Doktora Tezi, Van: Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri., 2001.
- Aktas M., Altay K., Dumanlı N.A.** Moleculer Survey of Bovine Theileria Parasites Among Apparently Healty Cattle and With a Note on the Distribution of Ticks in Eastern Turkey. *Vet. Parasitol.*, 2006; 138: 179-185.
- Arslan M.Ö., Umur Ş., Aydın L.** Kars Yöresi Sığırlarında *Ixodidae* Türlerinin Yaygınlığı. *Türkiye Parazitol. Derg.*, 1999; 23(3): 331-335.
- Aydın L.** Güney Marmara Bölgesi Ruminantlarında Görülen Kene Türleri ve Yayılışları. Doktora Tezi. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü., 1994.
- Aydın L.** Güney Marmara ruminantlarında görülen kene türleri ve yayılışları. *Türkiye Parazitol Derg.*, 2002; 24(2):194-200.
- Aydın L., Bakirci S.** Geographical distribution of ticks in Turkey. *Parasitology Research.*, 2007;101(2), 163-166.
- Aydın M. F., Aktaş M., Dumanlı N.** Türkiye'nin Karadeniz Bölgesindeki Koyun ve Keçilerde Kene Enfestasyonları. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.*, 2012; 18. (Suppl-A): A17-A22
- Bakirci S., Saralı, H., Aydın L., Eren H., Karagenc T.** Distribution and seasonal activity of tick species on cattle in the West Aegean region of Turkey. *Experimental and Applied Acarology.*, 2012; 56(2), 165-178.
- Barker S.C., Murrell A.** Systematics and Evolution of Ticks with a List of Valid Genus and Species Names. *Parasitology.*, 2004; 129: 15-36.

- Beyazıt A.** Bursa Yöresinde Sığırlarda *Ixodidae* Türlerinin Yayılışı. *Bornova Vet. Bil. Derg.*, 2000; 25 (39): 17–23.
- Byford R.L., Craig M.E.** Biology of Arthropods. BAKER, D.G. Blackwell Publishing. 2nd Ed., USA Sy. 57-59. 2007.
- Cicek H.** Epizootiological studies on Haemaphysalis ticks in Ankara province, Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 2004; 28(1), 107-113.
- Dantas-Torres F.** The Brown tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: *Ixodidae*): From taxonomy to control. *Vet. Parasitol.*, 2008;152: 173-185.
- Dumanlı N., Altay K., Aydın M.F.** Türkiye’de sığır, koyun ve keçilerde belirlenen kene türleri. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci.*, 2012; 3(2):67-72.
- Er A.** Manisa Yöresinde Görülen Kene (*Ixodidea*) Türleri Üzerine Araştırma. Manisa: Yüksek Lisans Tezi C.B.U. Fen Bil Enstitüsü., 1996.
- Estrada-Pena A., Bouattour A., Camicas J.L., Walker A.R.** Tick of Domestic Animals in the Mediterranean Region: a Guide to Identification of Species. University of Zaragoza. 1 st Ed. Spain Sy. 1-128, 2004.
- Gargılı A., Kar S., Yılmaz N., Cerit C., Sönmez G., Şahin F., Vatansver Z.** Evaluation of ticks biting humans in Thrace Province, Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 2010;16(Suppl-A), 141-146.
- Hoffmann G., Horchner F., Schein E., Gerber H.G.** Saisonales Auftreten von Zecken und Piroplasmen bei Haustieren in den asiatischen Provinzen der Türkei. *Berliner Münchener Tierärztl Wochenschr.*, 1971.
- Horak I.G., Camicas J.L., Keirans J.E.** The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): A World List of Valid Tick Names. *Exp. Appl. Acarol.*, 2002; 28: 27-54.
- İça A., Özkan F.** Kütahya Yöresi’nde Yayılış Gösteren Kene Türlerinin Araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg.*, 2015; 39, 117-23.
- İnci A., Yıldırım, A., Düzlü, Ö.** The Current Status of Ticks in Turkey: A 100-Year Period Review from 1916 to 2016. *Türkiye Parazitol Derg.*, 2016; 40 (3): 152-157.
- Jongejan F., Uilenberg G.** The global importance of ticks. *Parasitology*, 2004; 129(S1): S3-S14.
- Karaer Z.** Ankara İli ve Civarında Bulunan Kene Türleri ile *Hyalomma detritum*’un (Schulze, 1919) Bazı Ekolojik Özellikleri Üzerine Araştırmalar. *TÜBİTAK VII. Bilim Kongresi Tebliğleri.*, Sy. 371-378. 1983.
- Karaer Z., Yukarı B.A., Aydın L.** Türkiye Keneleri ve Vektörlükleri. Özcel, M.A., Daldal, N., *Artropod Hastalıkları ve Vektörler.* Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 1997; 13 Sy. 363-418.
- Kurtpınar H.** Türkiye Keneleri. Güven Matbaası, Ankara. Sy. 3-107, 1954.
- Mamak N., Gençer L., Özkanlar Y.E., Özçelik S.** Sivas-Zara Yöresindeki Sığır, Koyun ve Keçilerde Kene Türlerinin Belirlenmesi ve Sağaltımı. *Türkiye Parazitol. Derg.*, 2006; 30 (3): 209 – 212.
- Merdivenci A.** Türkiye Keneleri Üzerine Araştırmalar. Kutulmuş Matbaası, İstanbul. Sy. 1-420, 1969.
- Oytun H.Ş.** Tıbbi Entomoloji. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları. Sayı:49. 1. Baskı., Ankara. Sy. 55-176, 1956.
- Razmi G.R., Glinsharifodini M., Sarvi S.** Prevalence of Ixodid Ticks on Cattle in Mazandaran Province, Iran. *Korean J. Parasitol.*, 2007; 45 (4): 307-310.
- Sayın F., Dumanlı N.** Elazığ Bölgesinde Evcil Hayvanlarda Görülen Kene (*Ixodoidea*) Türleri ile İlgili Epizootiyolojik Araştırmalar. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 1982; 29 (3-4): 344-362.
- Taşçı S.** Van Bölgesinde Sığır ve Koyunlarda Görülen Kene Türleri ile Bunların Taşıdığı Kan Parazitleri (Protozoon) Arasındaki İlişkiler. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 1989; 36 (1): 53-63.
- Uilenberg G.** Significance of Tick Borne Haemoparasitic Disease to Animal Health in the Tropics. *Vet. Parasitol.*, 1995; 57: 19-41.
- Yay M., Yazar S., Aydın L., Şahin İ.** Kayseri Yöresi’nde sığır ve koyunlarda kene türlerinin araştırılması. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2004; 13, 25-9.
- Yukarı B.A., Umur S.** Burdur Yöresindeki Sığır, Koyun ve Keçilerde Kene (*Ixodoidea*) Türlerinin Yayılışı. *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, 2002; 26: 1263–1270.
- Zeybek H.** Samsun yöresi koyun ve kuzularında paraziter fauna saptama çalışmaları. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.*, 1980; 27: 215-36.
- Zeybek H., Kalkan A.** Ankara Yöresinde Mera Kenelerinin Yayılışı ve Mevsimlerle İlişkisi. *Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg.*, 1984; 5 (6-7): 14-21.

Broyler Tavuklarda Mersin, Biberiye ve Kekik Esansiyel Yağlarının Bağırsak Motilitesi Üzerine Etkisi[#]

Tuba BÜLBÜL^{1*}, Vural ÖZDEMİR², Elmas ULUTAŞ³, Aziz BÜLBÜL⁴

¹Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, Afyonkarabisar

²Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Afyonkarabisar

³Yozgat Bozok Üniversitesi, Sorgun Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Yozgat

⁴Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarabisar

[#]Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje no:16.VF.10).

[#]Bu çalışmanın bir kısmı, Dünya Bilimsel Tavukçuluk Derneği Türkiye Şubesi Uluslararası Kanatlı Kongresinde (9-12 Mayıs 2018, Niğde, Türkiye) sunulmuştur.

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

ÖZ

Bu araştırma, broyler beslemede yem katkı maddesi olarak yaygın kullanılmaya başlayan mersin, biberiye ve kekik esansiyel yağlarının ince bağırsak kasılımları üzerine etkisini belirlemek amacıyla yapıldı. Özel bir kanatlı mezbanesinde elde edilen (40-42 günlük) 10 adet ince bağırsak, krebs solüsyonu (NaCl, 118 mmol/l; KCl, 4.7 mmol/l; CaCl₂, 2.5 mmol/l; MgSO₄, 1 mmol/l; KH₂PO₄, 1 mmol/l glukoz 11, mmol/l; NaHCO₃, 25 mmol/l) ile +4 °C'de laboratuara getirildi. Duodenum, jejunum ve ileum dokuları, 39 °C sıcaklıkta ve %95 O₂ - %5 CO₂ gaz karışımı ile sürekli havalandırılan 20 ml krebs çözeltisi içerisinde olacak şekilde dört kadehli izole organ banyosuna yerleştirildi. Dokuların kasılımları "force transducer" ve "acquisition system" yardımı ile bilgisayarda görüntülenerek kaydedildi. Clevenger cihazın hidrodistilasyon metodu ile elde edilen mersin, biberiye ve kekik esansiyel yağları 0,1-1000 µg/ml derişim aralığında duodenum, jejunum ve ileum dokularına uygulanarak etkileri ve etkili dozları belirlendi. Aynı şekilde aynı dokularda asetilkolinin 10⁻¹⁰ - 10⁻³ M aralığı ile EFS (Electrical field stimulation; Elektriksel alam uyarımı) uygulanarak maksimal kasılımlar elde edildi. Üç yağında etkili dozları maksimal kasılımların elde edildiği asetilkolin ve EFS ile tekrar değerlendirildi. Her üç dokuda da biberiye ve kekik esansiyel yağlarının 1000 µg/ml, mersin yağının ise 300 ve 1000 µg/ml düzeylerinin spontan kasılımları tamamen engellediği diğer derişimlerin dokular üzerinde belirgin bir yanıt oluşturmadığı görüldü. Asetilkolin ve EFS ile uyarılmış dokularda ise esansiyel yağların etkili dozlarının kasılımları %15-35 aralığında engellediği ortaya konuldu. Sonuç olarak mersin, biberiye ve kekik esansiyel yağlarının ince bağırsak kasılımlarını engellediği *in vitro* olarak gösterildi. Ancak bu etkinin oluşması için yüksek dozlarda uygulanması gerektiği ifade edilebilir.

Anahtar kelimeler: Mersin, biberiye, kekik, esansiyel yağ, ince bağırsak

The Effect of Essential Oils of Myrtle, Rosemary, and Thyme on Intestinal Motility in Broiler

ABSTRACT

This research was conducted to determine the effects of essential oils of myrtle, rosemary, and thyme, which are common essential oils in broiler nutrition, on small intestine contractility. For this purpose, small intestines of 10 broiler chickens of 40-42 days old, which were sacrificed in a special slaughterhouse and were put into Krebs solution (NaCl, 118 mmol/l; KCl, 4.7 mmol/l; CaCl₂, 2.5 mmol/l; MgSO₄, 1 mmol/l; KH₂PO₄, 1 mmol/l glucose 11, mmol/l; NaHCO₃, 25 mmol/l) and transferred to the laboratories at +4 °C. Isolated strips of duodenum, jejunum and ileum were placed in a four-channeled, isolated organ bath system at 39 °C, ventilated by a mixture of 95% O₂ - %5 CO₂ regularly. The contractions of the tissues were recorded by displaying them on the computer with the help of "force transducer" and "acquisition system". The effective doses and effects of essential oils of myrtle, rosemary, and thyme, obtained by hydrodistillation method of Clevenger apparatus, were determined in a concentration range of 0.1-1000 µg / ml. Similarly, maximal contractions were obtained by applying EFS at acetylcholine concentrations in a range of 10⁻¹⁰ -10⁻³ M. The maximal effective doses of all three essential oils were re-evaluated at acetylcholine and EFS applications in which maximal contractions are obtained. It was determined that the essential oils of 1000 µg/ml of rosemary and thyme, and 300 and 1000 µg/ml levels of myrtle inhibited spontaneous contractions of all three tissues completely, whereas no significant responses were observed in these tissues at other concentration levels. In tissues stimulated by acetylcholine and EFS, the effective doses of the essential oils inhibited contractions in the range of 15-35%. In conclusion, the essential oils of myrtle, rosemary, and thyme were demonstrated to inhibit the contractions of small intestine *in vitro*. However, it has been observed that higher doses are needed to be applied to obtain this effect.

Keywords: Myrtle, rosemary, thyme, essential oils, small intestines

To cite this article: Bülbül T. Özdemir V. Ulutaş E. Bülbül A. Broyler Tavuklarda Mersin, Biberiye ve Kekik Esansiyel Yağlarının Bağırsak Motilitesi Üzerine Etkisi. Kocatepe Vet J. (2018) 11(4): 394-401.

GİRİŞ

Esansiyel yağlar; bitkilerin yaprak, çiçek, kabuk, tohum ve köklerinden elde edilen genellikle sıvı formda ve kolay kristalleşebilen; renksiz veya açık sarı renkte yağimsı karışımlardır. Buldukları bitkiye özgü, koku ve yakıcı lezzete sahip olup oda sıcaklığında uçucu ve kokulu olmaları en belirgin özelliklerindedir (Sevinç ve Merdun 1995). Suda çözünmeyip, organik çözücülerde çözündükleri için yağ olarak tanımlansalar da sabit yağlardan farklı yapıdadırlar (Bayaz 2014). İçerdikleri etken maddelere göre esansiyel yağların antimikrobiyal, antioksidan, sedatif ve diüretik etkileri bulunmakla beraber (Javanmardi ve ark. 2003) son zamanlarda kanatlı beslemede özellikle sindirimi uyarıcı ve iştah açıcı amaçla da kullanılmaya başlanmıştır (Hernandez 2004).

Esansiyel yağların kanatlı beslemede lezzet üzerine etkisi önem arz etmektedir (Bugdaycı 2008). Deyoe ve ark. (1962), tavukların tat tercihlerini belirlemek amacıyla yaptıkları bir çalışmada içme suyuna ilave edilen tereyağı aroması ve tereyağı ile birlikte melas, portakal, ayva, çikolata, soğan ve hindistan cevizi aromalarının, aroma ilavesi yapılmayan suya göre daha çok tüketildiğini bildirmişlerdir. Aynı zamanda esansiyel yağlarda bulunan eugenol ve nerolinin tavuklar tarafından istekle tüketilmediği bu yüzden yem tüketiminin buna bağlı azalabileceği bildirilmektedir. Baharat ve bitkilerden elde edilen esansiyel yağlar, besin maddelerinin sindiriminde etkili olurken (Pradeep ve ark. 1991, Pradeep ve Geervani 1994), bazıları safra tuzu sekresyonu üzerine etkili olmaktadır (Bhat ve ark. 1984, Bhat ve Chandrasekhara 1987, Sambaiyah ve Srinivasan 1991). Bitki ekstraktlarının broylerlerde besi performansı ve sindirilebilirlik üzerine etkilerinin incelendiği çalışmada rasyonlara 200 mg/kg esansiyel yağ ekstraktı-1 (oregano, tarçın ve biber) ve 5000 mg/kg esansiyel yağ ekstraktı-2 (adaçayı, kekik ve biberiye) ilave edilmesinin besin maddelerinin sindirilebilirliğini artırdığı bildirilmiştir (Hernandez ve ark. 2004). Kreydiyyeh ve ark. (2000) ise karanfil esansiyel yağında bulunan cinnamaldehyde ve eugenol'ün sırası ile 1000 ve 850 mg/kg düzeylerinde sıçan jejunumda alenin emilimini azalttığını ortaya koymuşlardır. Buna karşın broylerlerde 100 mg/kg timol, 100 mg/kg cinnamaldehyde ve 100 mg/kg ticari bir esansiyel yağ karışımının 21. ve 40. günlerde pankreas enzimlerinden amilaz, lipaz, tripsin ve kimotripsin enzim etkinliklerini değiştirmediği saptanmıştır (Lee ve ark. 2003).

Bitkisel ekstraktların ve yağların, düz kas kasılmaları üzerine farklı etkileri bulunmaktadır. Kemirgenlerde *Pavetta crassipes* bitkisinin yapraklarından elde edilen ve içeriğinde bol

miktarda flavonoidler, tanenler içeren ekstraktın bağırsak ve uterus düz kaslarının spontan kasılmaları üzerinde derişime bağlı olarak önleyici etki yaptığı belirtilmiştir. Etkisini kalsiyum kanalları boyunca oluşturduğu sonucuna varılmıştır. (Amos ve ark. 1998). Aynı şekilde *Neorautanenian mitis* bitkisinin ekstraktın izole rat uterusun normal ritmik kasılmalarını ortadan kaldırdığı ve ayrıca oksitosinle oluşturulan kasılmaları engellediği belirtilmiştir (Vongtau ve ark. 2000), *Onobrychis vicifolia* ekstraktının ise ince bağırsak kasılmalarını engellediği gösterilmiştir (İnce ve Filazi 2009). Tersine *Indigofera dendroides* bitkisinin ise kolinerjik yoldan kasılmayı artırdığı belirlenmiştir (Amos ve ark. 2003).

Son yıllarda kanatlı beslemede esansiyel (mersin, biberiye, kekik) yağlar yaygın kullanılmasına karşın ince bağırsak kasılmaları üzerine etkileri bilinmemektedir. Bu amaçla bu çalışmada mersin, biberiye ve kekik esansiyel yağlarının tavuk ince bağırsağında kasılmalar üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Araştırmada kullanılan esansiyel yağlar

Mersin, biberiye ve kekik esansiyel yağlar Clevenger cihazın hidrodistilasyon metodu ile elde edilmiştir.

Mersin, biberiye ve kekik esansiyel yağlarının ince bağırsak (duodenum, jejunum ve ileum) kasılmalarına etkisinin belirlenmesi

Araştırmada özel bir kanatlı mezbahanesinde elde edilen (40-42 günlük) 10 adet ince bağırsak hemen krebs solüsyonuna (NaCl 118; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; MgSO₄ 1, KH₂PO₄ 1, NaHCO₃ 25 ve glikoz 11 mM) alınarak +4 °C'de fizyoloji AD laboratuvarına getirildi. Takibinde her bir bağırsak bölümü krebs çözeltisi içerisine etrafındaki mezenter ve yağ dokudan dikkatli bir şekilde temizlenerek 0,1 -- 0,3 cm x 0,6 cm boyutlarında şerit şeklinde doku parçası elde edilmiştir. Hazırlanan bu preparatlar, 39 °C sıcaklıkta ve % 95 O₂ - % 5 CO₂ gaz karışımı ile sürekli havalandırılan 20 ml krebs çözeltisi içerisinde olacak şekilde izole organ banyosunun I, II, III ve IV numaralı olmak üzere her dört kadehindeki platin halka elektrotun alt ucuna bağlanarak dokunun halka elektrotlar arasında kalması sağlandı. Dokunun diğer ucu üst uçlarından force transducer'a bağlanıp tespit edilecek ve izometrik düz kas hareketleri "force transducer" ve "acquisition system" yardımı ile bilgisayarda görüntülenerek kaydedildi (Bulbul ve ark. 2007).

Duodenum, jejunum ve ileum üzerine ekstraktın etkisinin tek başına belirlenmesi

Dokular organ banyosunda dengelendikten sonra esansiyel yağlar 0,1 – 1000 µg/ml derişim aralığında ve her bir doz aralığı 3 dakika olacak şekilde kümülatif olarak duodenum, jejunum ve ileum dokusuna ayrı ayrı uygulandı. Dokular 15 dakika arayla 3 defa yıkanması koşuluyla belirtilen her bir derişim bireysel olarak duodenum, jejunum ve ileum dokusuna ayrı ayrı uygulandı (Bulbul ve ark. 2007).

Duodenum, jejunum ve ileum üzerine asetilkolinin etkisinin belirlenmesi

Dokuların organ banyosuna alışmaları için bir saat beklendikten sonra asetilkolinin 10^{-10} , 3×10^{-10} , 10^{-9} , 3×10^{-9} , 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} ve 10^{-3} M dozları sırasıyla kümülatif biçimde duodenum, jejunum ve ileum dokularına ayrı ayrı uygulandı. Uygulanan asetilkolin dozlarına cevap gözlemlendikten sonra iki dakika arayla iki kez yıkandı ve 10 dakika da bekletilerek doku dinlendirildi. Her doz için µg cinsinden elde edilen yanıtlar kaydedildi ve bunlardan ortalamalar hesaplandı.

Duodenum, jejunum ve ileum üzerine esansiyel yağların etkisinin asetilkolinle birlikte araştırılması

Dokular organ banyosunda dengelendikten sonra asetilkolinin üç dokuda da maksimal kasılım oluşturan dozu ile yağ ekstraktları beraber uygulandı. Elde edilen yanıtların % değerleri hesaplandı.

Duodenum, jejunumu ve ileumu üzerine esansiyel yağların elektriksel alan uyarımı (EFS) ile etkisinin belirlenmesi

Dokular organ banyosunda dengelendikten sonra EFS ile her iki doku için submaksimal kasılımın sağlandığı voltaj, frekans ve uyarı derinliği değerleri tespit edilecektir. Bunun için dokuya çeşitli düzeylerde elektrik akımı (10, 20, 30, 40 volt) farklı sürelerde (0,25, 0,5, 1 ms) ve sıklıkta (frekans) (2, 4, 8, 16, 32, 64 Hz) uygulandı (Bulbul ve ark. 2007). En iyi kasılımın meydana geldiği ortalama frekans değeri, uyarı derinliği ve voltaj yüksekliğinde esansiyel yağlarla kasılım yanıtlarının % değerleri tespit edildi.

İzole organ banyosu değerlendirmelerinde uygulamalar arasında fark olup olmadığının belirlenmesinde Tek Yönlü Varyans Analizi, farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek için ise Tukey testi yapıldı (SPSS 13.0). $P < 0.05$ değeri istatistiki açıdan önem sınırı kabul edildi.

Duodenum, jejunum ve ileum kasılımları üzerine mersin, biberiye ve kekik esansiyel yağlarının etkisi

Esansiyel yağların 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 100, 300 ve 1000 µg/ml derişimlerde kümülatif uygulaması sonucunda duodenum, jejunum ve ileumda farklı derişimlerde kademeli derişim-yanıtına uygun olmayan gevşemelere sebep olduğu görüldü. Biberiye ve kekik esansiyel yağlarının dokularda 0,1-1000 µg/ml derişimlerinin kümülatif ve bireysel olarak uygulanmasında 1000 µg/ml, mersin yağının ise 300 ve 1000 µg/ml dışındaki derişimlerinin dokular üzerinde belirgin bir yanıt oluşturmadığı, belirtilen derişimlerin uygulanması sonucunda dokulardaki normal (fazık) kontraksiyonların engellendiği görülmüştür. Buna karşın, yıkama işleminden sonra kasılımların tekrar başladığı belirlendi.

Duodenum, jejunum ve ileum kasılımları üzerine asetilkolinin etkisi

Duodenum, jejunum ve ileum dokuları üzerine uygulanan çeşitli konsantrasyonlardaki asetilkoline (10^{-10} , 3×10^{-10} , 10^{-9} , 3×10^{-9} , 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} ve 10^{-3} M) ait amplitut değerleri Çizelge 1’de ve bu kasılımlara ait doz-cevap eğrileri ise sırasıyla Şekil 1, 2 ve 3’ de gösterildi.

Buna göre her üç dokuda da asetilkolinin konsantrasyon artışına bağlı olarak amplitutlerde büyüme meydana geldiği gözlemlendi. Duodenum ve ileumda 3×10^{-4} M, jejunumda ise 10^{-4} asetilkolin dozuna alınan cevabın bir önceki cevaba oranla düştüğü gözlemlendiğinden esansiyel yağlarla olan denemelerde, maksimal kasılımı sağlayan etkili asetilkolin dozu olarak duodenum ve ileum için 10^{-4} , jejunum için 3×10^{-5} M konsantrasyon seçildi.

Duodenum, jejunum ve ileum kasılımları üzerine mersin, biberiye ve kekik esansiyel yağlarının etkisinin araştırılması

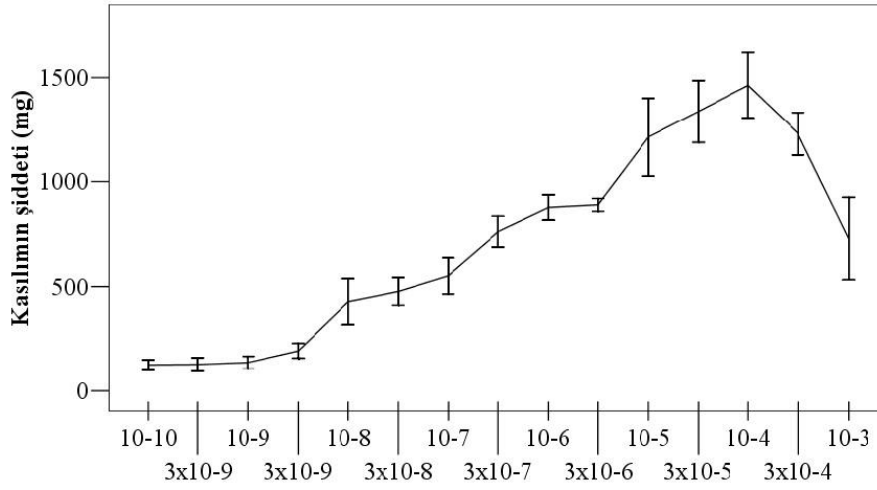
Mersin, biberiye ve kekik esansiyel yağlarının asetilkolin ile uyarılmış dokularda oluşturduğu inhibisyon Çizelge 2’ de gösterilmiştir. Buna göre esansiyel yağların duodenum, jejunum ve ileum düz kaslarında ACh tarafından oluşturulan maksimal kasılımda %14-43 aralığında inhibisyon oluşturduğu buna karşın kasılımları tamamen inhibe etmediği görüldü.

Duodenum, jejunum ve ileum üzerine esansiyel yağların EFS ile etkisinin belirlenmesi

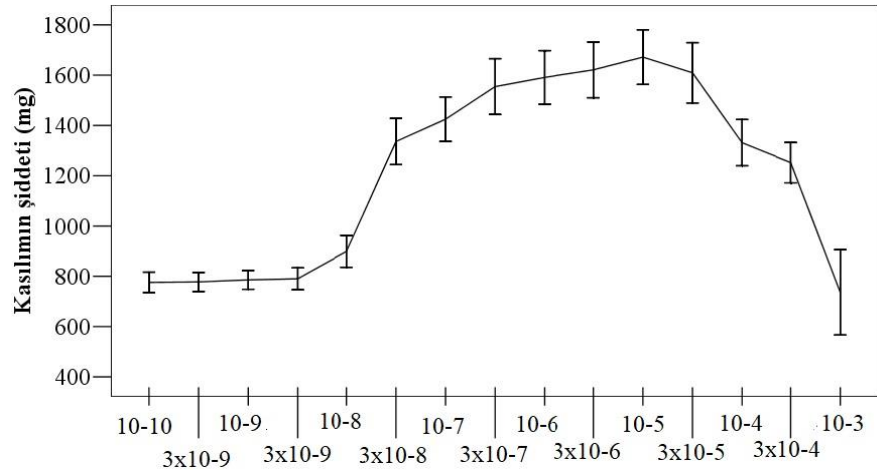
Mersin, biberiye ve kekik esansiyel yağlarının EFS ile uyarılmış dokularda oluşturduğu inhibisyon çizelge 3’ de gösterildi. Elektriksel alan uyarımı ile

duodenum, jejunum ve ileum düz kaslarında oluşturulan maksimal kasılımda %9-25 aralığında inhibisyon görüldü. Buna karşın esansiyel yağların

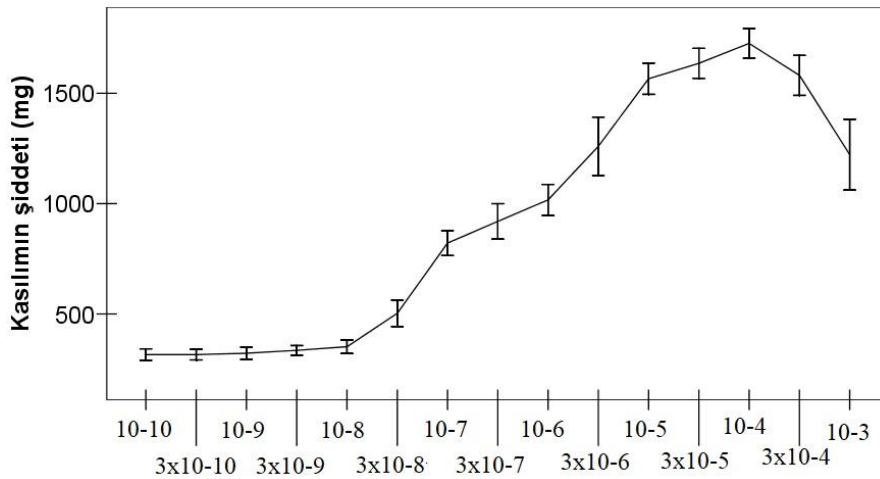
EFS ile oluşturulan maksimal kasılımları tamamen inhibe etmediği belirlendi.



Şekil 1. Duodenum düz kasında asetilkolinin doz cevap eğrisi



Şekil 2. Jejunum düz kasında asetilkolinin doz cevap eğrisi



Şekil 3. İleum düz kasında asetilkolinin doz cevap eğrisi

Çizelge 1. Duodenum, jejunum ve ileum düz kasları üzerine kümülatif olmayan asetilkolin uygulamasıyla elde edilen ortalama kasılım (mg) değerleri (n=6)

Konsantrasyon (M)	Kasılım (mg)		
	Duodenum	Jejunum	İleum
Ach 10 ⁻¹⁰ M	94±23,44	689±49,65	281±32,13
Ach 3x10 ⁻¹⁰ M	88±31,07	701±46,41	279±29,56
Ach 10 ⁻⁹ M	98±28,41	712±45,41	288±33,95
Ach 3x10 ⁻⁹ M	132±33,73	703±53,41	310±26,67
Ach 10 ⁻⁸ M	234±104,58	803±77,96	302±37,53
Ach 3x10 ⁻⁸ M	381±62,61	1198±112,44	412±73,27
Ach 10 ⁻⁷ M	432±82,05	1298±108,39	721±69,45
Ach 3x10 ⁻⁷ M	698±70,45	1384±135,67	800±98,28
Ach 10 ⁻⁶ M	765±57,61	1432±130,31	912±85,85
Ach 3x10 ⁻⁶ M	857±28,77	1456±135,70	1012±161,64
Ach 10 ⁻⁵ M	987±178,93	1540±133,27	1456±86,79
Ach 3x10 ⁻⁵ M	1141,83	1432±146,78	1554±82,98
Ach 10 ⁻⁴ M	1234±150,56	1130±112,68	1613±83,03
Ach 3x10 ⁻⁴ M	1131±97,60	1076±98,42	1413±110,82
Ach 10 ⁻³ M	456±187,23	378±208,26	913±196,47

Çizelge 2. Esasniyel yağların Ach ile uyarılmış dokularda oluşturduğu % inhibisyon

Dokular	Mersin 300 µg	Mersin 1000 µg	Biberiye 1000 µg	Kekik 1000 µg
Duodenum	14,80±0,38	36,41±0,34	35,47±1,98	18,88±1,23
Jejunum	19,63±1,38	42,47±2,03	30,87±1,11	17,67±1,05
İleum	14,93±1,42	38,44±2,28	32,46±1,54	21,19±1,33

*Asetilkolin duodenum ve ileumda 10⁻⁴, ileumda 10⁻⁵ M uygulanmıştır

Çizelge 3. Esansiyel yağların EFS ile uyarılmış dokularda oluşturduğu % inhibisyon

Dokular	Mersin 300 µg	Mersin 1000 µg	Biberiye 1000 µg	Kekik 1000 µg
Duodenum	8,80±0,44	15,58±0,48	13,47±1,08	17,14±0,38
Jejunum	13,53±1,18	16,13±0,43	16,87±1,01	22,09±1,05
İleum	9,93±0,78	17,89±1,02	24,64±1,05	14,09±0,36

* Her üç doku içinde 20 volt 0,5 ms ve 32, 64 Hz elektrik uygulandı

TARTIŞMA

Son yıllarda kanatlı beslemede esansiyel yağlar, birçok fonksiyonun yanı sıra sindirim düzenleyicisi olarak kullanılmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmalarda esansiyel yağların besin maddelerinin

sindiriminde görevli enzimler üzerine etkili olabileceği ifade edilmiştir (Bhat ve ark., 1984; Bhat ve Chandrasekhara, 1987; Sambaiah ve Srinivasan, 1991). Günümüzde esansiyel yağların mide bağırsak sistemi kasılımlarını düzenleyerek de sindirime yardımcı olabileceği ifade edilmektedir. Nitekim

kemirgenlerde *Pycnocycla caespitosa* (Sadraei ve ark., 2016) *Benium persicum* (Ghader ve ark., 2011), *Pterodon polygalaeiflorus* (Leonhardt ve ark., 2010), *Chrysactinia Mexicana* (Daniel ve ark., 2016), *Teucrium polium* (Sadraei ve ark., 2001) ve koyunda *Mentha longifolia* (Ghader ve ark., 2012) bitkilerinden elde edilen esansiyel yağların ratlarda mide bağırsak sisteminde kasılmaları engellediği gösterilmiştir. Yukarıda bildirilen yağlar dışında yağların içerisinde bulunan terpenlerin ve fenolik bileşiklerin de kasılmaların üzerine etkileri incelenmiştir. Terpenlerden β -caryophyllene (Sadraei ve ark., 2003), 1,8-sineol (Pinto ve ark., 2009) ve Eucalyptol'un (Ponce-Monter ve ark., 2008) düz kas kasılmalarını engellediği gösterilmiştir. Benzer şekilde 1,8-sineol'un trakeal düz kaslarda K ile uyarılmış kasılmaları azalttığı, casimiroa pringlei uçucu yağının temel bileşenlerinden olan saf ticari piperiton, ökaliptol ve alfa-terpineolün ise sıçan uterusu üzerinde spazm çözücü bir etkiye neden olduğu gösterilmiştir (Ribeiro ve ark., 2010). Flavonoidler fenolik bileşiktir ve bağırsak peristaltizmine etkileri vardır (Di Carlo ve ark., 1993). Genistein ve kersetin gibi flavonoidler, tavşan duodenumunun düz kasında spontan kasılmaların genliğini azalttığı, ancak sıklığını değiştirmediği belirlenmiştir. Genistein etkisine kalsiyum ve potasyum kanalları aracılık ederken, quercetin'in etkisinin cAMP ve protein kinaz A'dan kaynaklandığı gösterilmiştir (Santos-Fagundes ve ark., 2015).

Bu çalışmada, biberiye ve kekik esansiyel yağlarının dokularda 1000 $\mu\text{g/ml}$, mersin yağının 300 ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ dozlarında her üç dokuda (duodenum, jejunum ve ileum) normal (fazik) kasılmaları tamamiyle engellerken, diğer dozların etkisiz olduğu görülmüştür. Buna karşın kasılmaları engelleyen dozların mersin için yüksek, kekik ve biberiye için ise çok yüksek dozlarda olduğu görüldü.

Asetilkolinin, mide bağırsak sisteminde parasempatik innervasyonun önemli bir sinirsel aracısı olup muskarinik reseptörleri uyararak düz kas kasılımına neden olduğu bilinmektedir. Mide-bağırsak kanalı düz kaslarında muskarinik reseptörlerin M1, M2, M3, M4 ve M5 olmak üzere 5 alt tipi bulunmaktadır (Giraldo ve ark., 1987; 1988; Iino ve ark. 2004). M2 (%70-80) ve M3 (%20-30) reseptörler ince bağırsaktaki düz kas hücre membranında yaygın bir şekilde bulunurken, M1, M5 ve M4 çok daha az yoğunlukta bulunmaktadır (Iino ve ark. 2004). M1, M3, M5 reseptörlerinin aktivasyonu fosfoinozitol hidrolizi ve kalsiyum salınımı aracılığıyla görev yaparken, M2 ve M4 reseptörlerinin aktivasyonu sAMP birikimini engelleyerek görev yapmaktadır. M2 reseptörlerinin sAMP seviyeleri üzerindeki inhibitör etkisi bu reseptörlerin dolaylı rolünü ortaya koymaktadır

(Ehlert ve ark., 1999a, 1999b). Aynı zamanda kobay ileumunda M2 reseptörlerinin, zar depolarizasyonu için katyonik kanalların açılmasında önemli bir role sahip olduğu bildirilmektedir (Zholos ve Bolton, 1997). Valentino ve ark. (1979)'nın izole kobay ileumunda yaptıkları çalışmada etkili doz olarak 5×10^{-6} M dozunu kullanmaları, Korczynski ve ark. (2006)'nın ise rat jejunumunda yaptıkları çalışmada etkili doz olarak 10^{-5} M dozunu kullanmaları farklı hayvan türlerinde muskarinik reseptör dağılımı ve yoğunluğunun farklı olduğunu akla getirmektedir. Bu çalışmada, her üç dokuda da asetilkolinin konsantrasyon artışına bağlı olarak amplitutlerde büyüme meydana geldiği gözlemlendi. Duodenum ve ileumda, 3×10^{-4} M, jejunumda ise 10^{-4} asetilkolin dozuna alınan cevabın bir önceki cevaba oranla düştüğü gözlemlendiğinden esansiyel yağlarla olan denemelerde, maksimal kasımları sağlayan etkili asetilkolin dozu olarak duodenum ve ileum için 10^{-4} , jejunum için 3×10^{-5} M konsantrasyon seçildi. Bu bağlamda aynı hayvan türünde farklı dokularda (duodenum, jejunum ve ileum) asetil kolinin doz farklılığının reseptör dağılımındaki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Elektriksel alan uyarımı ince bağırsaklarda bifazik kasılmaları nöranal olarak uyarılmaktadır (Sadraei ve ark., 2013). Aynı zamanda kasılımın oluşmasında adrenerjik ve kolinerjik olmayan sinirlerden salınan nörotransmitter maddelerin aracılık ettiği bildirilmektedir (Ekblad ve Sundler 1993). Bu çalışmada bildirimlere uygun olarak üç dokudada maksimal kasılmalar 20 volt 0,5 ms ve 32, 64 Hz EFS uygulaması ile elde edilmiştir.

Bu çalışmada her üç esansiyel yağda 300 $\mu\text{g/ml}$ veya üzeri düzeylerde spontan kasılmaları tamamen inhibe ederken asetilkolin veya EFS ile uyarılmış dokularda kasılmaları tamamen engellemediği buna karşılık kasılımın şiddetini azalttığı görülmüştür. Bu bağlamda asetilkolinin muskarinik reseptörler üzerinden EFS'nin ise ise NANC sinirlerden salınan nörotransmitterler üzerinden etkinlik gösterdiği düşünüldüğü zaman; mersin, biberiye ve kekik esansiyel yağlarının başka bir mekanizma ile ince bağırsak kasılmalarını inhibe ettiği görülmektedir.

SONUÇ

Mersin, biberiye ve kekik esansiyel yağlarının ince bağırsak kasılmaları üzerine 100 $\mu\text{g/ml}$ 'dan düşük düzeylerde etkinlik göstermezken; Mersin için 300 $\mu\text{g/ml}$, biberiye ve kekik için 1000 $\mu\text{g/ml}$ düzeyinde spontan kasılmaların tamamen engellendiği belirlenmiştir. Bu etkinin muskarinik reseptörler veya NANC nörotransmitterler üzerinden oluşmadığı anlaşılmış, olasılıkla da

etkisini kalsiyum kanalları üzerinden göstermiş olabileceği öngörülmüştür. Mersin, biberiye ve kekik esansiyel yağların *in vitro* kasılımlar üzerine etkinlik gösteren düzeyleri ile kanatlı beslemede kullanılan düzeyleri değerlendirildiğinde bu yağların yem katkı maddesi olarak rasyona ilave edilen miktarlarının ince bağırsak motilitesi üzerine etkisinin olamayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Amos S, Okwuasaba FK, Gamaniel K, Akah P, Wambebe C.** Inhibitory effects of the aqueous extract of *Pavetta crassipes* leaves on gastrointestinal and uterine smooth muscle preparations isolated from rabbits, guinea pigs and rats. *J. Ethnopharmacol.* 1998; 61: 209–213.
- Amos S., Binda L, Kunle OF, Okafor I, Emeje M, Akah PA, Wambebe C, Gamaniel K.** Smooth muscle contraction induced by *Indigofera dendroides* leaf extracts may involve calcium mobilization via potential sensitive channels. *Phytother. Res.* 2003; 17: 792–796.
- Bayaz M.** Esansiyel yağlar: Antimikrobiyal, Antioksidan ve Antimutajenik Aktiviteleri. Akademik Gıda. 2014; 12(3): 45-53
- Bhat BG, Chandrasekhara N.** Effect of black pepper and piperine on bile secretion and composition in rats. *Nahrung.* 1987; 31: 913-916.
- Bhat BG, Srinivasan MR, Chandrasekhara N.** Influence of curcumin and capsaicin on the composition and secretion of bile in rats. *J. Food Sci. Tech.* 1984; 21: 225-227.
- Bugdaycı KE, Ergün A.** Esansiyel yağ ve/veya probiyotiğin broylerlerde performans, immun sistem ve bazı kan parametreleri üzerine etkisi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 2011; 58: 279-284
- Bulbul A, Yağcı A, Altunbaş K, Sevimli A, Celik HA, Karadeniz A, Akdağ E.** The role of nitric oxide in the effects of ovarian steroids on spontaneous myometrial contractility in rats. *Theriogenology.* 2007; 68(8): 1156–1168
- Daniel ZM, Laura G, Miguel ÁZS, Salud PG, María DM.** Antispasmodic effects and action mechanism of essential oil of *chrysactinia mexicana* a. gray on rabbit Ileum. *Molecules.* 2016; 21(6):783; doi:10.3390/molecules21060783
- Deyoe CW, Davies RE, Krishnan R, Khaund R, Couch J.R.** Studies on the taste preference of the chick. *Poult. Sci.* 1962; 41: 781-784. In: **Lee KW, Everts H, Beynen AC.** Essential oils in broiler nutrition. *Int. J. Poult. Sci.* 2004; 3(12): 738-752.
- Di Carlo GL, Autore G, Izzo AA, Maiolino P, Mascolo N, Viola P, Diurno MV, Capasso F.** Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationships. *J Pharm Pharmacol.* 1993; 45(12):1054-9.
- Ehlert FJ, Sawyer GW, Esqueda EE.** Contractile role of M2 and M3 muscarinic receptors in gastrointestinal muscle. *Life Sci.* 1999; 64 (6-7): 387-394.
- Ekblad E, Sundler F.** Motor responses in rat ileum evoked by nitric oxide donors vs. field stimulation: Modulation by pituitary adenylate cyclase activating peptide forskolin and guanylate cyclase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 283:23–28.
- Ghader JA, Massoud M, Bahram DN, Farshad K.** Effects of mentha longifolia essential oil on ruminal and abomasal longitudinal smooth muscle in sheep. *The Journal of Essential Oil Research.* 2012; 24: 61–69
- Ghader JA, Massoud M, Bahram DN, Farshad K.** Effects of Bunium persicum (Boiss.) Essential Oil on the Contractile Responses of mooth Muscle: an in vitro Study. *Veterinary Research Forum.* 2011; 2: 87-96
- Giraldo E, Monferini E, Ladinsky M, Hammer R.** Muscarinic receptor heterogeneity in kobay intestinal smooth muscle: binding studies with AFDX 116. *Eur. J. Pharmacol.* 1987; 141: 475-477.
- Giraldo E, Vigano MA, Hammer R, Ladinsky H.** Characterization of muscarinic receptors in kobay ileum longitudinal smooth muscle. *Mol. Pharmacol.* 1988; 33: 617-625.
- Hernandez F, Madrid J, Garcia V, Orengo J, Megias MD.** Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poult. Sci.* 2004; 83: 169 – 174.
- Ince S, Filazi A.** (2009) Farelerde Korunga Bitkisinin (Onobrychis viciifolia) Bağırsaklara Etkisi. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 2009; 15: 401-406.
- Iino S, Ward SM, Sanders KM.** Interstitial cells of Cajal are functionally innervated by excitatory motor neurones in the murine intestine. *J Physiol.* 2004; 556:521–30.
- Javanmardi J, Stushnoff C, Lcke E, Vivanco JM.** Antioxidant activity and total phenolic

content of Iranian *Acimum* Accessions. *Food Chemistry*. 2003; 83: 547-550.

- Korczynski W, Ceregrzyn M, Kato I, Wolinski J, Zabielski R.** The effect of orexins on intestinal motility in vitro in fed and fasted rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2006; 57(6): 43-54.
- Kreydiyyeh SI, Usta J, Copti R.** Effect of cinnamon, clove and some of their constituents on the Na⁺-K⁺-ATPase activity and alanine absorption in the rat jejunum. *Food Chem. Toxicol.* 2000; 38: 755-762.
- Lee KW, Everts H, Kappert HJ, Frehner M, Losa R, Beynen AC.** Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female chickens. *Br. Poult. Sci.* 2003; 44(3): 450-457.
- Leonhardt V, Leal-Cardoso JH, Lahlou S, Albuquerque AA., Porto RS, Celedônio NR, Oliveira AC, Pereira RF, Silva LP, Garcia-Teófilo TM, Silva AP, Magalhães J, Duarte GP, Coelho-De-Souza AN.** Antispasmodic effects of essential oil of *Pterodon polygalaeiflorus* and its main constituent β -caryophyllene on rat isolated ileum. *Fundam Clin Pharmacol.* 2010; 24(6):749-58. doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00800.x.
- Pinto NV, Assreuy AM, Coelho-De-Souza AN, Ceccatto VM, Magalhães PJ, Lahlou S, Leal-Cardoso JH.** Endothelium-dependent vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of *Alpinia zerumbet* and its main constituent 1,8-cineole in rats. *Phytomedicine*. 2009; 16: 1151-1155.
- Ponce-Monter H, Pérez S, Pérez C, Zavala M, Oropeza M, Cárdenas N, Campos M.** Chemical composition and antispasmodic effect of *Casimiroa pringlei* essential oil on rat uterus. *Fitoterapia*. 2008; 79: 446-450.
- Pradeep KU, Geervani P, Eggum BO.** Influence of spices on utilization of sorghum and chickpea protein. *Plant Food Hum. Nutr.* 1991; 41: 269-276.
- Pradeep KU, Geervani P.** Influence of spices on protein utilization of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) and horsegram (*Dolichos biflorus*). *Plant Food Hum. Nutr.* 1994; 46: 187-193.
- Ribeiro TP, Porto DL, Menezes CP, Antunes AA, Silva DF, De Sousa DP, Nakao LS, Braga VA, Medeiros IA.** Unravelling the cardiovascular effects induced by alpha-terpineol: a role for the nitric oxide-cGMP pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010; 37: 811-6.
- Sadraei H, Hajhashemi V, Ghannadi A, Mohseni M.** Antispasmodic effect of aerial part of *teucrium polium* l. essential oil on rat isolated ileum in vitro. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran.* 2001; 14: 355-358
- Sadraei H, Asghari G, Alipour M.** Anti-spasmodic assessment of hydroalcoholic extract and essential oil of aerial part of *Pycnocycla caespitosa* Boiss.&Hausskn on rat ileum contractions. *Res. Pharm. Sci.* 2016; 11: 33-42.
- Sadraei H, Asghari G, Emami S.** Inhibitory effect of *Rosa damascena* Mill flower essential oil, geraniol and citronellol on rat ileum contraction. *Res Pharm Sci.* 2013; 8:17-23
- Sadraei H, Ghannadi A, Malekshahi K.** Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions. *Fitoterapia*. 2003; 74: 445- 52
- Sambaiah K, Srinivasan K.** Secretion and composition of bile in rats fed diets containing spices. *J. Food Sci. Tech.* 1991; 28: 35-38.
- Santos-Fagundes D, Grasa L, Gonzalo S, Valero MS, Castro M, Arruebo MP, Plaza MA, Divina-Murillo M.** Different mechanisms of actions of genistein, quercetin on spontaneous contractions of rabbit duodenum. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 2015; 107: 413-416.
- Sevinç A, Merdun B.** Türkiyede yetisen uçucu yağ içeren bitkiler ve kullanım alanları. Bitirme ödevi, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü. 1995.
- Valentino RJ, Smith CB, Woods JH.** An unusual benzazocine elicits acetylcholine release in the isolated kobay ileum. *Nature.* 1979; 281: 370-372.
- Vongtau HO, Amos S, Binda L, Kapu SD, Gamaniel KS, Kunle OF, Wambebe C.** Pharmacological effects of the aqueous extract of *Neorautanenia mitis* in rodents. *J. Ethnopharmacol.* 2000; 72: 207-214.
- Zholos AV, Bolton TB.** Muscarinic receptor subtypes controlling the cationic current in guinea-pig ileal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 1997; 122: 885-893.

Effects of Lonidamine-Loaded Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles on Cardiac Fibrosis Induced By High-Dose Testosterone Propionate In Adult and Neutered Male Rats[#]

Mehmet Eray ALCIGIR^{*1}, Ceyda Tuba SENDEL TÜRK², Canan HASÇIÇEK², Okan EKİM³

¹ Kirikkale University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, 71451, Kirikkale- Turkey

² Ankara University, Faculty of Chemists, Department of Pharmaceutic Technology, 06500, Ankara- Turkey

³ Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Anatomy, 06110, Ankara-Turkey

[#]This study was derived from a Project supported by funding received from the Scientific and Technological Research Projects Funding Program (TUBITAK) under project number 114S132.

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

ABSTRACT

In recent years, the usage of exogenous testosterone has tripled in humans. Although, mechanism has not yet been fully elucidated, there is a correlation between the increased risk of heart failure and testosterone usage. The aim of this study was to demonstrate cardiac fibrosis, which a main finding of hearth failure, in testosterone propionate-applied male rats and to show its regression by Lonidamine as an anti-hyperplastic agent. A total of 72 adult Wistar albino and neutralized male rats were divided into 4 groups (n=18 in each groups). Animals in all groups were received to testosterone propionate until 2nd, 4th, and 12th weeks (n=6 in each groups). Subsequently, group I and II also received the pure solution of Lonidamine hydrochloride and its lipid-polymer hybrid nanoparticulate formulation via intraprostatic injection. Group III, blank lipid-polymer hybrid nanoparticle formulation were solely administrated via same way. The control group or group IV were received only testosterone. At the end of the experiment period, hearts were collected and fibrocytic changes were confirmed by histochemical and immunohistochemical methods. Histopathologically, fibrosis were lower in group I and II when compared to that of group III and IV. Immunohistochemically, bFGF, cyclin D1 and p16 protein expressions were evaluated. bFGF and cyclinD1 epxpressions correspondingly to increasing fibrosis were found higher in last two groups during the experiment. But, p16 expressions were lower in Lonidamine treated-group I and II. In conclusion, results of this study supported that testosterone propionate may promote cardiac fibrosis. Lonidamine hydrochloride may be used in its prevention of fibrosis.

Keywords: Cardiac fibrosis, Lonidamine hydrochloride, Testosterone, Rat.

Yetişkin ve Kastre Edilmiş Erkek Ratlarda Yüksek Doz Testosteron Propiyonatin İndüklediği Kardiyak Fibrozis Üzerine Lonidamin Yüklü Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Etkisi

ÖZ

Son yıllarda, insanlarda ekzojen testosteron kullanımı üç katına çıkmıştır. Mekanizma henüz tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen kalp yetmezliği riskini arttırdığına dair bir korelasyon vardır. Bu çalışmanın amacı, erkek sıçanlarda testosteron propiyonat kullanımının kalp yetmezliğinin temel bulgusu olan fibrozise yol açtığını ve bir anti-hiperplastik ajan olan Lonidaminin bunu geriletici etkisini göstermektir. Çalışmada, toplam 72 adet kastre edilmiş, yetişkin Wistar albino erkek sıçan kullanıldı ve hayvanlar 4 ana gruba ayrıldı (her bir grupta için n= 18). Bu ana gruplar 3 alt gruba ayrılarak (n=6 her bir grup için) hayvanlara, 2., 4. ve 12. haftalara kadar testosteron propiyonat uygulandı. Grup I ve II için, Lonidamin hidroklorür, saf çözelti içinde ve bunun lipit-polimer hibrit nanopartikül formülasyonu halinde prostatlara enjekte edildi. Grup III için sadece lipit-polimer hibrit nanopartikül formülasyonu uygulandı. Kontrol grubu olarak grup IV'de sadece testosteron uygulandı. Çalışmanın sonunda kalpler toplandı. Histopatolojik olarak fibrosis grup I ve II'de grup III ve IV'dekiyle karşılaştırıldığında daha düşüktü. İmmünohistokimyasal olarak bFGF, siklin D1 ve p16 protein ekspresyonları değerlendirildi. Son iki grupta, artan fibrozise karşılık gelen bFGF ve siklinD1 ifadeleri, deney sırasında daha yüksek bulundu. Ancak, p16 ifadeleri Lonidamin uygulanan grup I ve grup II'de daha düşüktü. Sonuç olarak, bu sonuçlar testosteron propiyonatin kardiyak fibrozisi etkileyebileceğini desteklemektedir ve fibrozisin önlenmesinde Lonidamin hidroklorür kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Kardiyak fibrozis, Lonidamin hidroklorür, Testosteron, Sıçan.

To cite this article: Alçigir M.E. Sengel Türk C.T. Hasçıçek C. Ekim O. Effects of Lonidamine-Loaded Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles on Cardiac Fibrosis Induced By High-Dose Testosterone Propionate In Adult and Neutered Male Rats. Kocatepe Vet J. (2018) 11(4): 402-413.

INTRODUCTION

Heart failure is predominant problem overall the world. The incidence between men and women can be changed dependently to sex differences (Weidner 2000; Cleland et al. 2001). The usage of exogenous testosterone or other anabolic steroids on human cardiac health is still controversial. Particularly, the risk in men cardiac failure can be increased when used supplementally. This risk is higher in men when compared in that of women at every age (Thurm and Borlak 2002; Grunewald and Matsumoto 2003).

Myocardial tissues of left ventricles may be more affected and therefore systolic and diastolic functions may be easily deteriorated as result of continuously usage of testosterone supplying in men (D'Andrea et al. 2007; Hassan et al. 2009). Testosterone may cause hypertrophy in cardiac myocyte because they have functional androgen receptors. These receptors have been indicated in humans, dogs, and rats (Marsh et al. 1998). In this context, the rat is a good and usefull model for understanding human cardiac health (Doggregel and Brown, 1998).

Endogenous testosterone also effects cardiac failures and is likely to modulate the fibrosis and collagen deposits also it is reported that castration decreased the cardiac fibrosis when compared to intact males (Hori et al. 2008; Yang et al. 2017). Related with the cardiac fibrosis progression of hypertension, coronary heart disease, heart failure, and other cardiovascular diseases, and it may initiate myocardial remodeling (Hori et al. 2008; Porter and Turner, 2009).

It is believed that several biomolecules, including growth factors and cytokines, activate proliferation of cardiac fibroblasts (CFs) and modulate the expression of extra cellular matrix (ECM) (Frangogiannis, 2012). Cyclin D1, which is a protein of cycline dependent kinases, plays an important role in the development of proliferative disease and oncogenesis as a cell cycle regulator (Fu et al. 2004). It is reported that overexpressed cyclin D1 by rodent fibroblasts enhanced cooperation in response of basic fibroblast growth factor (bFGF) and thereby stimulation in fibroblastic cell cycle progression and anchorage-independent growth of cells (Tashiro et al. 2003). P16, which is also known as cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, plays an reversal role in cell cycle regulation because it prevents proliferation and provide cellular senescence (Serrano et al. 1993; Rayess et al. 2012). It is reported that p16 takes a role in fibroblast senescence. For p16, such antifibrotic activity is thought because of fibroblast senescence is duty on

prevention of myocardial fibrosis by antifibrotic activity (Zhu et al. 2013; Meyer et al. 2016; Xie et al. 2017). For prevention and treatment of cardiac fibrosis, no effective remedy could not still be found. Main interest has focused on suppress the symptoms. However, it should take a more necessary and factual steps on treatment of fibrosis-attenuating mechanism. It is reported that current pleiotropic drugs could fortunately solve the problem of developing cardiac fibrosis out. In this process, it has stated that biochemical microenvironment focused therapies taking under control the development of fibrosis should be paid attention and such therapies should be developed (Bronnum and Kalluri 2012).

Lonidamine (LND) which is known since over 30 years has been known to have anti-neoplastic and antiproliferative effects (Caputo and Silvestrini 1992). LND make an effects on neoplastic cells inhibiting lactate export by the proton-linked monocarboxylate transporter(s) (MCT) and pyruvate uptake into mitochondria. Furthermore, LND also inhibit indirectly hexokinase activity there (Floridi et al. 1981a; Floridi et al. 1981b). As result of this enzymatic blokade, cytosolic and extracellular pH decrease in neoplastic cells by increasing lactate (Nath et al. 2015a; Nath et al. 2015b). But, according to reports, this effect of LND is selective on normal tissues if provided dose are under approximately 400 mg/m² (oral or i.v. doses) (Price et al 1995; Price et al. 1996). And, it does not affect cell progression (Caputo and Silvestrini 1992). In the current study, it was aimed that the relationship between some molecular factors providing and attenuating cardiac fibrosis and overdose testosterone in adult rat modelling has been emphasized and the usefull effect of Lonidamine as a lipid-polymer hybrid nanoparticle formulation has been proven for prevention of cardiac fibrosis inducing high testosterone.

METHODS

Preparing of Lonidamine nanoparticles

To investigate the effect of Lonidamine on myocardial cells and fibrosis, pure Lonidamine and Lonidamine-loaded lipid-polymer of hybrid nanoparticles were applied to separate groups. Lonidamine encapsulated lipid-polymer hybrid nanoparticles were prepared through one-step self-assembly approach technique. Thirteen hybrid nanoparticle formulations were produced based on a Design of Experiment (DoE) approach and the optimized one was selected (Sengel-Turk and Hascicek 2017). Composition of the optimum nanoparticle formulation are tabulated in Table-1. Blank nanoparticles were prepared in the same way except Lonidamine.

Table 1. Content of the Lonidamine-loaded optimum lipid-polymer hybrid nanoparticles.

Fomulation content	Amount
Organic Phase	
Poly-D,L-lactide-co-glycolide (PLGA)	4000 µg
Lonidamine	600 µg
Acetonitrile	1600 µl
Aqueous Lipid Phase	
1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-carboxy(poly(ethyleneglycol) (DSPE-PEG-COOH) 2000	800 µg
Lecithin	50 µg
Ethanol solution	850 µl
Water (enough amount)	16000 µl

Animal exposure

Approval for the study was granted by the Local Ethics Committee of Animal Experiments, Ankara University (date of 15.11.2017 decision no. 2017-23-185). Male Wistar rats were mated in the Animal Research Laboratory, Faculty of Medicine, Ankara University. The animals were maintained at a temperature of 22°C-24 °C and 55% humidity with a 12-hr light/12-hr dark cycle. Detailed descriptions of the experimental procedures are given below. All procedures were performed according to the guidelines stated in the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

The neutralizing procedure was performed by incising the scrotal sac under general anesthesia by species dosage of xylazine and ketamine hydrochloride combination. Seven days after this manipulations, animals were divided into 4 groups (n=18). Testosterone propionate applications, at the 150 mg/kg dose, were applied at twice to all animals via intraperitoneal route at the 2nd and 12th weeks of the experiment. Animals were sacrificed (n=6 for the dates of 2nd, 6th and 12th weeks) using high dose of xylazine-ketamine combination of at the end of experiment and the hearts of rats were collected for pathomorphological and immunohistochemical examinations.

Group I (pure Lonidamine+testosterone): After testosterone propionate administration according to procedure, 2 mg/kg/day dose of Lonidamine hydrochloride was dissolved into PBS was applied to prostate of rats in this group (n=18). For this aim, in this group, the lower abdomen was opened 1.5 cm under the anesthesia of the animals and 200 µl sterile samples were injected with the insulin injector into ventral prostate loops and the animals were awakened by suturing the abdominal membranes, muscles and skin of the animals after injection. Group II (Lonidamine-loaded nanoparticles+testosterone): After testosterone propionate administration using same method, lipid-polymer hybrid nanoparticles containing 2

mg/kg/day dose of Lonidamine hydrochloride was applied to the prostate of rats (n=18).

Group III (blank nanoparticles+testosterone): After testosterone propionate administration using same method, lipid-polymer hybrid nanoparticles at same dose was applied to the prostate of rats (n=18).

Group IV (testosterone): Only testosterone propionate using same method was applied to prostate of rats in this group (n=18).

Macroscopic and Histopathological examination

Heart samples were collected from all animals. Sizes (cm) of left-right atriums and ventricles at outside measurements were measured using digital compass and mean \pm standard deviation was calculated for each determined dates of experiment in all groups. Then, the tissues were fixed in 10% buffered formalin. After fixation, the tissues were processed through degraded alcohol and xylene series and embedded in paraffin wax. Sections of 4µm thickness were cut from the paraffin blocks. The sections were stained with haematoxylin-eosin (H&E) and Masson's Trichrome stainings (by being followed to instructions of manual Bioptica, Italy) and evaluated under a light microscope (Olympus BX51 digital microscope) and illuminated using camera attachment (Olympus DP25 camera). A total of 10 High Power Fields in 400x magnification (10 HPFs) was counted for scoring of histopathological findings. For calculation of mean \pm standard deviation, the mean scores were entered in each column established for all groups on the Excel spreadsheet and their standard deviations were calculated (Microsoft Excel Program).

Immunohistochemical method

In the study, in harmony with its procedure, the strep Avidin-Biotin Complex Peroxidase (strep ABC-P) kit (Peroxidase Detection System, RE7110-K, Leica, Novocastra) was used. The sections taken from the paraffin blocks were used. Deparaffinized and rehydrated sections were digested with trypsin for 10 min under 37° C.

Then, for revealing of antigenic determinants, sections placed in citrate buffer (pH 6.0) were kept in a microwave oven at 600 W for 15 minutes. To eliminate endogenous peroxidase activity, the tissues were kept in 3% hydrogen-peroxide (H₂O₂)-methanol solution for 15 minutes. Non-specific protein activity was prevented with the use of blocking serum (Novocastra, Leica). Incubation with primary antibodies (Cyclin D1, ABIN782606, in 1:400 dilution), (bFGF, ABIN726425, in 1:500 dilution), (p16, Santa Cruz, sc-1661, in 1:200 dilution) was left overnight at +4°C. The rest of the procedure was executed in accordance with the streptavidin biotin complex peroxidase (Strept ABC-P) staining method (Novocastra, Leica). In this process, the tissue slices were rinsed twice for 5 minutes, using PBS at the end of each phase, except in the protein blocking phase. For the control sections, PBS was used instead of primary antibody as the negative control. Diaminobenzidine (DAB) was used as chromogen, while Gill's hematoxylin was used as ground staining. The slices were covered using Entellan® which is a non-aqueous mounting medium.

RESULTS

Macroscopical findings

In terms of lengths and widths of atrium and ventricles for left and right sites, measurements in Group I were lower than in that of Group II. However, when compared to Groups I and II which were administrated by different Lonidamine forms, there were much higher measurements in Groups III and IV. As compared between Group III and Group IV, identical measurements were obtained. The atrial dimensions were slightly increased at 4th and 12th weeks when compared to initial week of the experiment. There was no significant increase in atrial measurements of Group I and II when compared to that of other groups. In terms of ventricle dimension for left and right sites, the situation amongst groups was like to be in atrial measurements. The mean digits were lower in first two groups when compared to other groups. The situation was found differently during experimental procedure. The mean digits followed stable without any significant change for all groups. All results are illustrated in Table-2.

Histopathological and histochemical findings

Cytoplasm and nuclei of cardiomyocytes were found more hypertrophic in some areas of left ventricles of Group III and IV. However, in Groups I and II, cardiomyocytes were often normal in appearance. Additionally, a number of fibrocytes and fibroblast were accorded to the interstitium of cardiomyocytes in Groups III and IV. Especially, significant increase were detected in Group III when compared to Group

IV during the experiment. The mean digits for 2nd and 12th weeks of the experiment were found identical in Group IV. The cells in affected areas were easily differentiated in special staining. However, the number of these connective tissue cells were much lower in Groups I and II, which were administrated with pure Lonidamine and nanoparticulate form of Lonidamine, during the experiment process (Figures-1 and 2).

Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) expressions

The expressions in all experimental groups showed great parallelism to each other. The positive reactions were observed in cytoplasm of the fibrocyte and fibroblast as brownish color. These expressions during ongoing time were become more increased in all groups. However, the increase was slighter in Groups I and II when compared to Groups III and IV at each euthanasied day (Figure-3).

Cyclin D1 expressions

The positive reactions were seen in cytoplasm and lesser degree of nuclei as brownish color. The expressions were in low level in Groups I and II. Particularly, those expressions were slightly-higher in 12th week of the experiment when compared to be in 2nd and 4th week. The level of expressions was much higher in Groups III and IV at each euthanasied day. But, cyclin D1 expressions were slightly higher in 12th week of the experiment. The expression levels between 4th and 12th weeks of experiment were similar to be in histopathological results and bFGF expressions (Figure-4).

P16 expressions

The positive reactions were seen in cytoplasm and nuclei, previously. In general, the expressions were more decreased when compared to previous expressions. The level of expressions was again in low during experiment in 2nd week of Groups I and II. In the ongoing period of the experiment, the level of expression kept in stable. However, in Groups III and IV, the expressions were higher in 2nd week when compared to other euthanasied day of experiment. The level of expressions were getting more decreased until 12th week in Groups III and IV. In particular, prominent decreasing were observed in 12th week of Group IV. When a comparison of 12th week of experiment between Groups III and IV, the expression was lower in Group IV than in that of Group III (Figure-5). All histopathological scores and immunohistochemicals expressions obtained in the study are illustrated in Graph-1.

Table-2: Measurements of atrium and ventricle according to groups

Duration of experiments / Groups	2nd week				4th week				12th week			
	GI	GII	GIII	GIV	GI	GII	GIII	GIV	GI	GII	GIII	GIV
Lenght												
Right atrium	2.40±0.83	3.25±0.38	4.25±0.90	4.16±0.37	2.91±0.60	3.00±0.57	4.21±0.73	3.75±0.62	3.00±0.28	3.50±0.28	4.00±0.50	3.50±0.28
Left atrium	3.08±0.93	3.50±0.28	4.41±0.73	4.75±0.55	3.58±1.01	3.58±0.73	4.36±0.37	4.83±0.23	3.75±1.34	4.08±0.53	4.08±0.18	4.50±0.40
Right ventricle	15.80±2.48	14.91±0.83	13.66±3.14	13.5±2.06	12.5±2.06	11.93±0.60	13.41±1.78	14.16±0.74	11.83±3.84	12.66±1.49	13.66±1.34	14.25±0.80
Left ventricle	10.58±1.96	11.75±0.90	12.33±1.79	13.16±2.06	11.5±2.75	10.41±0.93	13.33±1.49	13.75±1.57	11.5±1.97	10.66±1.14	13.08±1.09	13.66±0.84
Width												
Right atrium	1.16±0.2	1.66±0.37	1.80±0.47	1.58±0.18	1.00±0.50	1.75±0.38	1.83±0.23	2.33±0.23	2.33±1.46	1.40±1.8	2.66±0.37	2.33±0.23
Left atrium	1.91±0.83	1.58±0.44	1.50±0.50	1.75±0.25	1.33±0.37	1.82±0.44	2.91±0.34	4.15±0.40	2.00±1.00	1.41±0.34	3.91±0.18	4.75±0.47
Right ventricle	1.40±0.20	1.91±0.34	2.16±0.47	2.58±0.34	1.50±0.40	1.75±0.25	2.16±0.47	2.58±0.34	1.25±0.25	1.58±0.34	2.50±0.28	3.00±0.28
Left ventricle	2.91±1.01	2.83±0.23	4.50±0.76	4.33±0.37	2.66±0.47	3.58±0.73	3.75±0.25	4.66±0.37	3.00±0.00	3.08±0.18	3.75±0.25	4.50±0.40

The scoring was given as mean±standard deviation (SD) by calculation of total animals in each group. Experimental groups were coded from GI to GIV. (GI: Group I; GII: Group II; GIII: Group III; GIV: Group IV). The results were given on the basis of centimeter (cm).

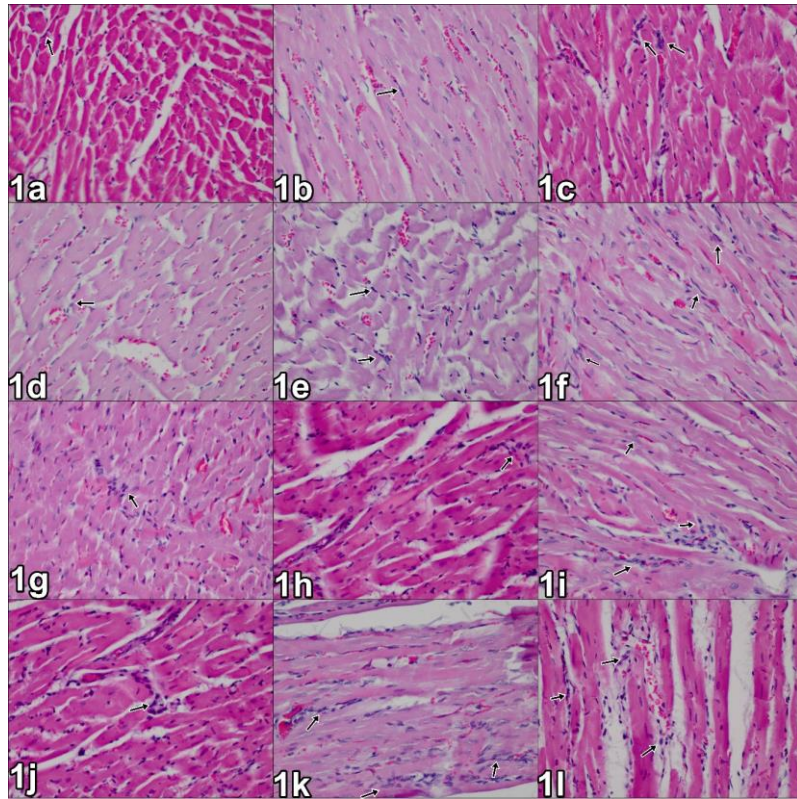


Figure 1. Progress of cardiac fibrosis in all groups during 2nd to 12 th week. Fibrocytes were marked with arrows. Group I (a-c), Group II (d-f), Group III (g-i), and Group IV (j-l), x400, HXE staining.

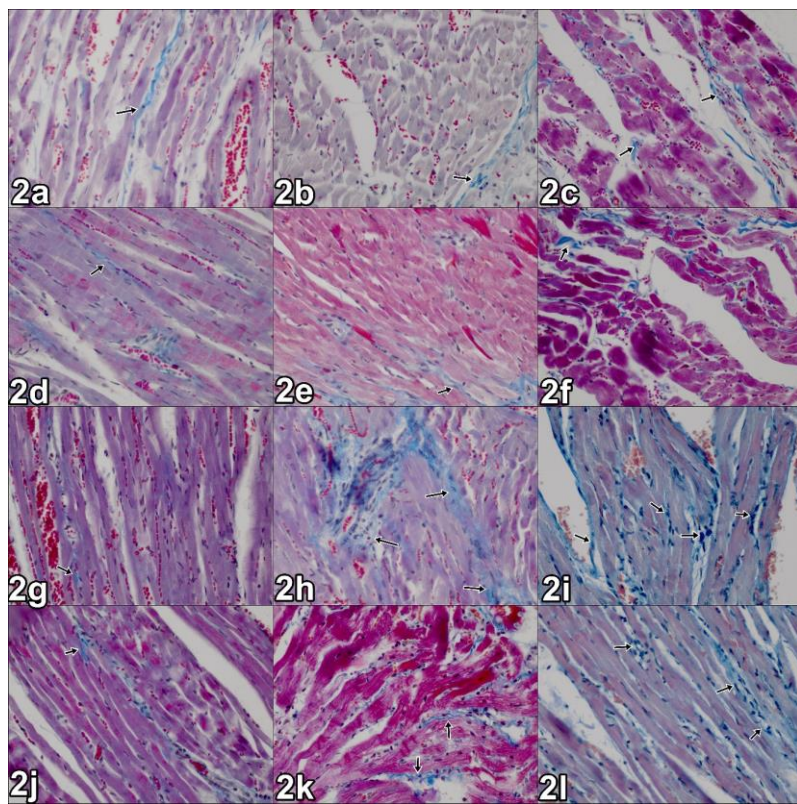


Figure 2. Progression of cardiac fibrosis in all groups during 2nd to 12 th week by Masson's trichrome stain. Group I (a-c), Group II (d-f), Group III (g-i), Group IV (j-l), x400, Masson's Trichrome stain.

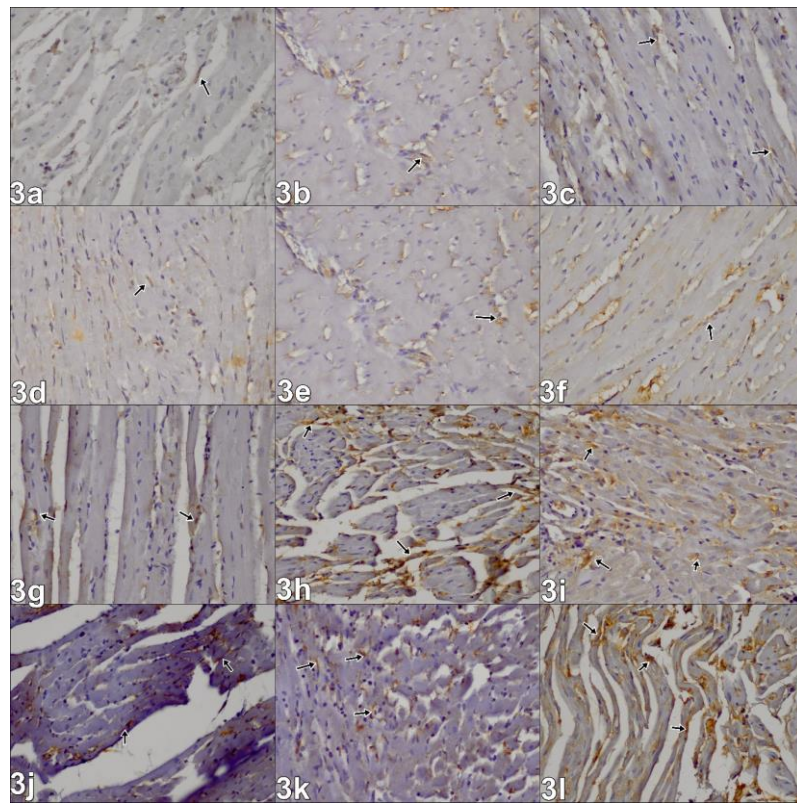


Figure 3. bFGF expressions in cardiac tissue in all groups during 2nd 12th week. Group I (a-c), Group II (d-f), Group III (g-i), Group IV (j-l), x400, Strept ABC-P immunostaining with Gill's hematoxylin and DAB Chromogen.

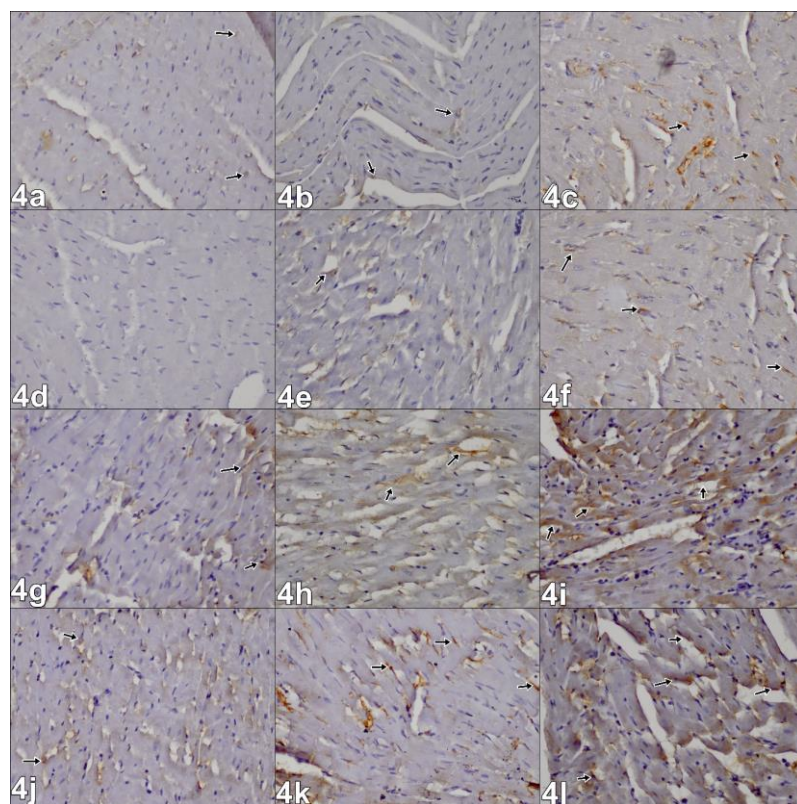


Figure-4. Cyclin D1 expressions in cardiac tissue in all groups during 2nd 12th week. Group I (a-c), Group II (d-f), Group III (g-i), Group IV (j-l), x400, Strept ABC-P immunostaining with Gill's hematoxylin and DAB Chromogen.

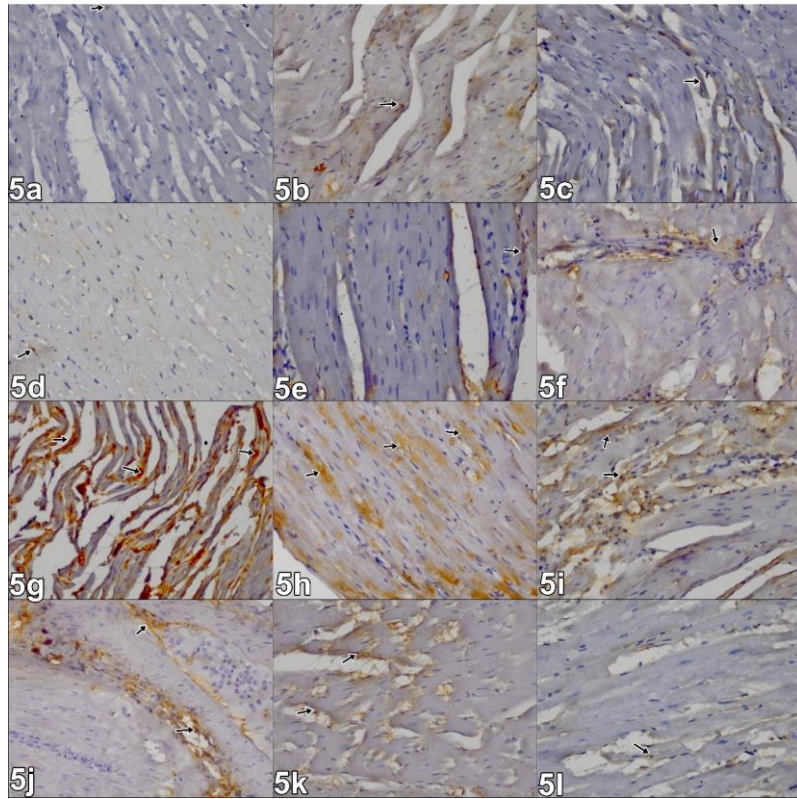
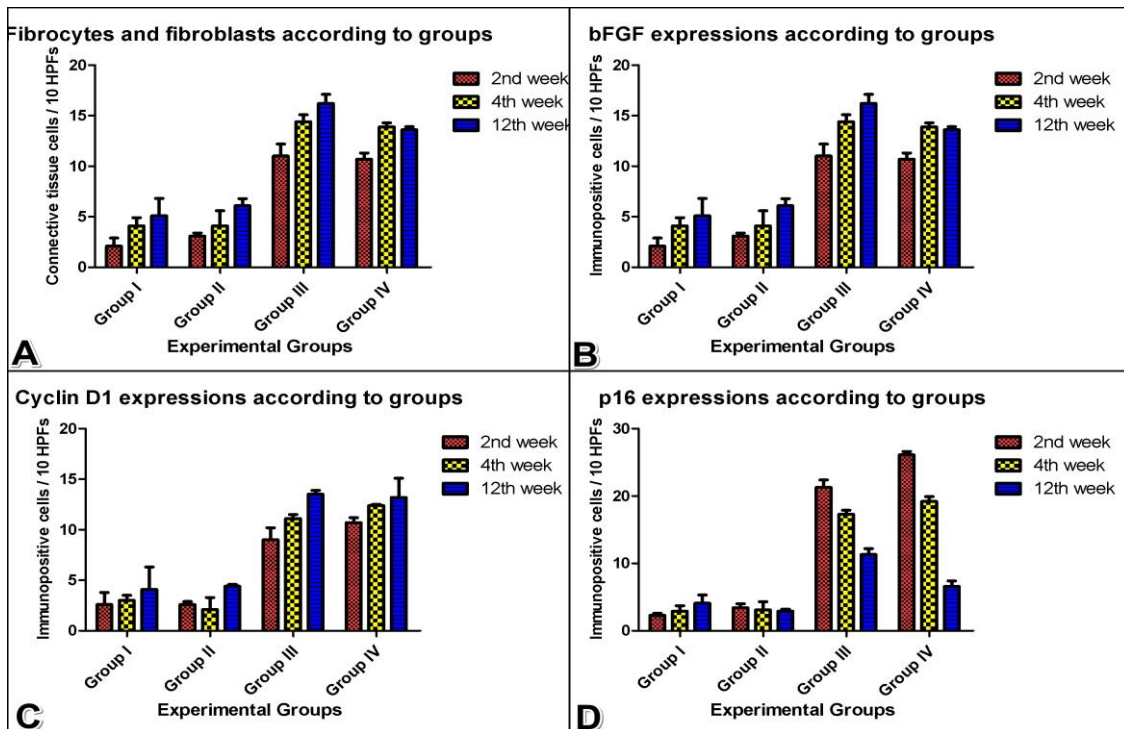


Figure-5. P16 expressions in cardiac tissue in all groups during 2nd 12th week. Group I (a-c), Group II (d-f), Group III (g-i), Group IV (j-l), x400, Strept ABC-P immunostaining with Gill's hematoxylin and DAB Chromogen.



Graph 1. Graphical comparison of histological and immunohistological data between groups.

DISCUSSION

In this study, development of cardiac fibrosis induced by high-dose testosterone and the reversal effect of Lonidamine in nanoparticle and pure form has been investigated in adult and neutered rats.

Testosterone which is known as anabolic steroid and its supplementation has a negative effect onto cardiovascular functions after chronic misuse (Toma et al. 2012, Culic 2015). In general, systolic and diastolic dysfunction are associated with its usage in the presence of myocardial hypertrophy (Hassan et al. 2009, Angel et al. 2012, Pirompol et al. 2016). Pirompol et al. (2016) has studied the development of cardiac hypertrophy in the early and late phases of testosterone administration in spite of experienced in 4th, 8th and 12th weeks of experiment. However, they observed most prominent findings in relation to the hypertrophic development in cardiac muscles after long-term treatment by testosterone. In our study, we also observed the cardiac hypertrophy both in early and late phase (12th week). However, the findings were increased toward 12th week of experiment. Macroscopical findings supported these results. Both atrial and ventricle dimensions were increased in Groups III and IV when compared to

Lonidamine treated groups or Groups I and II. In this point, we have found a strong correlation between cardiac hypertrophy and testosterone administration. Particularly, we observed most outstanding hypertrophic changes in solely testosterone group or Group IV and free nanoparticle form of Lonidamine group or Group III. In spite of that we found more decreased in cardiac hypertrophy in group administrated by pure form of Lonidamine group or Group I and Lonidamine-loaded hybrid nanoparticles or Group II. As different above, we encountered also different histopathological findings in association with cardiac fibrosis in the interstitial areas by using special stain. Cardiac fibrosis was more common and outstanding when compared to hypertrophy in cardiac muscles. These lesions and others such as disorganized muscle fibers, misshapen nuclei and increasing apoptosis have also been described in previous studies (Belhani et al. 2009, Papamitsou et al. 2011, Angell et al. 2012, Angell et al. 2014).

Although there are several postulates resulting in cardiac failures, molecular mechanism is not fully understood. In an investigation, which studied in heart of adult transgenic mice, cyclin D2 overexpression has been resulted in significant cardiomyocyte proliferation (Pasumarthi et al. 2005). Because cyclin D1 as cell cycle regulator is an important factor in the development of

proliferative disorders, there have been found some studies in relation to the role of cyclins in development of fibrosis at different organs except for cardiomyocytes (Fu et al. 2004, Kato et al. 2005, Watts et al. 2006). In our study, we described an increased cyclin D1 expression in especially testosterone induced group and Lonidamine nanoparticle free group during the experiment. In other groups, which treated with Lonidamine, we observed significantly lower expressions when compared to other groups during the 2nd, 4th and 12th weeks of experiment. We attributed this situation to both development of cardiac fibrosis and cardiac hypertrophy in heart muscle under testosterone activity.

In contrast to this information, cell cycle inhibitors have a potential effect on recession of cardiac lesions. In another investigation which studied in neonatal and adult hearts, it is reported that there are low levels of cell cycle inhibitors such as cyclindependent kinase inhibitors (CDKIs) due to an increased cardiomyocyte number (Di Stefano et al. 2011). In our study, we also encountered with a serious down-regulation of p16 for Groups III and IV, which is another cyclin dependent kinase inhibitor. In these groups, the expressions were higher in 2nd week. However, the expressions were decreased in ongoing times. On the other side, in Group I and II, the expressions were very low during 2nd, 4th and 12th weeks of experiment when compared to Group III and IV. According to recent literatures (Zhu et al. 2013, Meyer et al. 2016, Xie et al. 2017), it is stated that p16 might have antifibrotic role on progression of fibroblast senescence. For this situation in terms of literature searches, we postulate that there is a possible association between p16 as an inhibitor of cyclin dependent kinase and cardiac fibrosis. In this point, Lonidamine known as anti-hyperplastic agent might have been related likely to inhibit the function of p16 because it is encountered to a possible relation between low p16 expression and fibrosis or fibrocyte proliferation.

On the other side, Lonidamine (LND) has antiproliferative activity for long time (Caputo and Silvestrini 1992). Particularly, this effect is produced by inhibiting hexokinase activity and consequently disturbing mitochondrial process (Floridi et al. 1981a; Floridi et al. 1981b). In previous reports regarding dose dependent effectivity of LDN, it is mentioned that it has selective on normal tissues in presence of optimal dose and it has no disadvantageous on normal cell progression (Caputo and Silvestrini 1992; Price et al 1995; Price et al. 1996). However, there have been documented that LND might also affect negatively normal cells in contrast to previous knowledges. Especially, cell death, fibrosis and also

decrease in vascularization might develop after blockade of hexokinase activity in cardiac tissue during experimental studies (Wu et al. 2011; Pasdois et al. 2012; Nederlof et al. 2016). Hence, several hexokinase blockers like LND might not make a positive effect on intact cells at every time. In this study, we did not observe any negative effects on healthy cardiomyocytes in contrast to recent knowledges. We detected only anti-fibrocytic activity on cardiac tissues. But, to the best of author knowledges, this situation might be resourced from dose-dependent response. Some intact cardiomyocytes as well as hyperplastic cells would be negatively affected from overdose LND if proper dose for body weight was not selected. However, this knowledge obtained from our study should be supported by new in-vivo studies considering dose-dependent response.

In conclusion, we believe that testosterone administration can create cardiac hypertrophy and fibrosis for long duration as much as to effect macroscopical measurements of atrium and ventricles. In development of this process, cyclin dependent kinase and its inhibitors may have a potential role according to results of the experiment. Lonidamine may be useful preventive medicine for cardiogenic failures originated from excess hormone usage. But, to show exact effectiveness of Lonidamine, it needs to be supported by new investigations in this way and to be experimented by different dosage in rat modelling. We believe that only when the results to be obtained from new phase investigations, a proper dosage can give to the patients with cardiac problems.

Conflict of Interest

There is no any conflict of interests with other authors, sources and the funding program.

REFERENCES

- Angell PJ, Chester N, Green DJ.** Anabolic steroid use and longitudinal, radial, and circumferential cardiac motion, *Med Sci Sports Exerc.* 2012; 44: 583–590.
- Angell PJ, Ismail TF, Jabbour A, Smith G, Dahl A, Wage R, Whyte G, Green DJ, Prasad S, George K.** Ventricular structure, function, and focal fibrosis in anabolic steroid users: a CMR study. *Eur J Appl Physiol.* 2014; 114(5):921-928.
- Belhani D, Fanton L, Vaillant F, Descotes J, Manati W, Tabib A, bui-xuan B, Timour Q.** Cardiac Lesions Induced by Testosterone: Protective Effects of Dexrazoxane and Trimetazidine. *Cardiovas Toxicol.* 2009; 9: 64-69.
- Brønnum, H., Kalluri, R.** Cardiac fibrosis: Cellular and molecular determinants. In *Muscle* (Vol. 1). Elsevier Inc, USA, 2012; pp. 389-404.
- Caputo, A, Silvestrini, B.** Lonidamine, a New Approach to Cancer Therapy. *Oncology.* 1984;41:2–6.
- Cleland JG, Khand A, Clark A.** The heart failure epidemic: exactly how big is it? *Eur Heart J.* 2001; 22:623-626.
- Culic V.** Androgens in cardiac fibrosis and other cardiovascular mechanisms, *Int J Cardiol.* 2015; 179: 190–192.
- D'Andrea A., Caso P., Salerno G., De Corato G, Mita C, Di Salvo G, Severino S, Cuomo S, Liccardo B, Esposito N, Calabrò R.** Left ventricular early myocardial dysfunction after chronic misuse of anabolic androgenic steroids: a Doppler myocardial and strain imaging analysis, *Br J Sports Med.* 2007; 41:149–155.
- Di Stefano V, Giacca M, Capogrossi MC, Crescenzi M, Martelli F.** Knockdown of cyclin-dependent kinase inhibitors induces cardiomyocyte re-entry in the cell cycle. *J Biol Chem.* 2011; 286: 8644–8654.
- Doggrell SA, Brown L.** Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res.* 1998; 39(1):89-105.
- Floridi A, Paggi MG, D'Atri S, De Martino C, Marcante ML, Silvestrini B, Caputo A.** Effect of lonidamine on the energy metabolism of Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res.* 1981; 41(11 Pt 1): 4661-4666.
- Floridi A, Paggi MG, Marcante ML, Silvestrini B, Caputo A, De Martino C.** Lonidamine, a selective inhibitor of aerobic glycolysis of murine tumor cells. *J Natl Cancer Inst.* 1981b; 66(3):497-499.
- Frangogiannis NG.** Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease. *Physiol Rev.* 2012; 92:635–88.
- Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG.** Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinol.* 2004, 145(12):5439-47.
- Gruenewald DA, Matsumoto AM.** Testosterone supplementation therapy for older men: potential benefits and risks. *J Am Geriatr Soc.* 2003, 51: 101–115.

- Hassan NA, Salem MF, Sayed MA.** Doping and effects of anabolic androgenic steroids on the heart: histological, ultrastructural, and echocardiographic assessment in strength athletes. *Hum Exp Toxicol.* 2009; 28 273–283.
- Hori Y, Uechi M, Ebisawa T, Yamano S, Yoshioka K, Mutoh KI.** The influence of gender on cardiac fibrosis induced by sympathetic stimulation. *Chin J Physiol* 51(3): 146–151. Erratum in *Chin J Physiol.* 2008; 31 51(4): 261.
- Kato A, Bamba H, Shinohara M, Yamauchi A, Ota S, Kawamoto C, Yoshida Y.** Relationship between expression of cyclin D1 and impaired liver regeneration observed in fibrotic or cirrhotic rats. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005; 20(8):1198-1205.
- Marsh JD, Lehmann MH, Ritchie RH, Gwathmey JK, Green GE, Schiebinger RJ.** Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation* 1998; 98: 256-261.
- Meyer K, Hodwin B, Ramanujam D, Engelhardt S, Sarikas A.** Essential Role for Premature Senescence of Myofibroblasts in Myocardial Fibrosis. *J Am Coll Cardiol.* 2016; 67: 2018-2028.
- Nath K, Nelson DS, Heitjan DF, Zhou R, Leeper DB, Glickson JD.** Effects of hyperglycemia on lonidamine-induced acidification and de-energization of human melanoma xenografts and sensitization to melphalan. *NMR Biomed.* 2015; 28(3): 395-403.
- Nath K, Nelson DS, Heitjan DF, Leeper DB, Zhou R, Glickson JD.** Lonidamine induces intracellular tumor acidification and ATP depletion in breast, prostate and ovarian cancer xenografts and potentiates response to doxorubicin *NMR Biomed.* 2015; 28(3):281-290.
- Nederlof R, Gürel-Gurevin E, Eerbeek O, Xie C, Deijs GS, Konkel M, Hu J, Weber NC, Schumacher CA, Baartscheer A, Mik EG, Hollmann MW, Akar FG, Zuurbier CJ.** Reducing mitochondrial bound hexokinase II mediates transition from non-injurious into injurious ischemia/reperfusion of the intact heart. *J Physiol Biochem.* 2016; 73(3):323-333.
- Papamitsou T, Barlagiannis D, Papaliagkas V, Kotanidou E, Dermentzopoulou-Theodoridou M.** Testosterone-induced hypertrophy, fibrosis and apoptosis of cardiac cells—an ultrastructural and immunohistochemical study. *Med Sci Monit.* 2011; 17: 266–273.
- Pasdois P, Parker JE, Halestrap AP.** Extent of mitochondrial hexokinase II dissociation during ischemia correlates with mitochondrial cytochrome c release, reactive oxygen species production, and infarct size on reperfusion. *J Am Heart Assoc.* 2012; 31;2(1):e005645.
- Pasumarthi KBS, Nakajima H, Nakajima HO, Soonpaa MH, Field LJ.** Targeted expression of cyclin D2 results in cardiomyocyte DNA synthesis and infarct regression in transgenic mice. *Circ Res.* 2005; 96: 110–118.
- Pirompol P, Teekabut V, Weerachayanukul W, Bupha-Intr T, Wattanapernpool J.** Supra-physiological dose of testosterone induces pathological cardiac hypertrophy. *J Endocrinol.* 2016; 229(1):13-23.
- Porter KE, Turner NA.** Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Therap.* 2009; 123 (2):255.
- Price GS, Page RL, Riviere JE, Cline JM, Thrall DE.** Effect of whole-body hyperthermia on the pharmacokinetics and toxicity of lonidamine in dogs. *Int. J. Hyperth.* 1995; 11(4): 531-544.
- Price GS, Page RL, Riviere JE, Cline JM, Thrall DE.** Pharmacokinetics and toxicity of oral and intravenous lonidamine in dogs. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1996; 38(2):129-135.
- Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES.** Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *International Journal of Cancer.* 2012; 130 (8): 1715–1725.
- Sengel-Turk CT, Hascicek C.** Design of lipid-polymer hybrid nanoparticles for therapy of BPH: Part 1. Formulation optimization using a design of experiment approach. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 2017; 39: 16-24.
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D.** A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature.* 1993; 366 (6456): 704–707.
- Tashiro E, Maruki H, Minato Y, Doki Y, Weinstein IB, Imoto M.** Overexpression of cyclin D1 contributes to malignancy by up-regulation of fibroblast growth factor receptor 1 via the pRB/E2F pathway. *Cancer Res.* 2003; 15;63(2):424-31.

- Thum T, Borlak J.** Testosterone, cytochrome P450, and cardiac hypertrophy. *FASEB J.* 2002;16: 1537-1549.
- Toma M, McAlister FA, Coglianese EE.** Testosterone supplementation in heart failure: a meta-analysis. *Circ Heart Fail.* 2012; 5: 315–321.
- Watts KL, Cottrell E, Hoban PR, Spiteri MA.** RhoA signaling modulates cyclin D1 expression in human lung fibroblasts; implications for idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res.* 2006; 7:88. 43.
- Weidner G.** Why do men get more heart disease than women? An international perspective. *J Am Coll Health.* 2000; 48(6):291-294.
- Wu R, Smeele KM, Wyatt E, Ichikawa Y, Eerbeek O, Sun L, Chawla K, Hollmann MW, Nagpal V, Heikkinen S, Laakso M, Jujo K, Wasserstrom JA, Zuurbier CJ, Ardehali H.** Reduction in hexokinase II levels results in decreased cardiac function and altered remodeling after ischemia/reperfusion injury. *Circ Res.* 2011;108(1):60-69.
- Xie J, Chen Y, Hu C, Pan Q, Wang B, Li X, Geng J, Xu B.** Premature senescence of cardiac fibroblasts and atrial fibrosis in patients with atrial fibrillation. *Oncotarget.* 2017; 8(35):57981-57990.
- Yang X, Wang Y, Yan S, Sun L, Yang G, Li Y, Yu C.** Effect of testosterone on the proliferation and collagen synthesis of cardiac fibroblasts induced by angiotensin II in neonatal rat. *Bioengineered.* 2017; 2;8(1):14-20.
- Zhu F, Li Y, Zhang J, Piao C, Liu T, Li HH, Du J.** Senescent cardiac fibroblast is critical for cardiac fibrosis after myocardial infarction. *PLoS One.* 2013; 8: e74535.

Afyonkarahisar İlinde Satışa Sunulan Tavuk Eti ve Sakatatlarında *Salmonella* spp. Varlığının Belirlenmesi[#]

Ulaş ACARÖZ¹, Zeki GÜRLER^{1*}, Recep KARA¹, 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 çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi tarafından 16.KARİYER.144 proje numarası ile desteklenmiştir.

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

ÖZ

Doğada yaygın olarak bulunan *Salmonella* etkenleri, insan ve hayvanlarda perakut septisemi, akut ve kronik enteritis ile karakterize infeksiyonlara yol açmakta olup hayvanlar arasında bulaşma eğiliminin hızlı olması nedeniyle ekonomik önem taşımaktadır. Bu çalışmada, Afyonkarahisar'da satışa sunulan tavuk eti ve sakatatlarının *Salmonella* spp. kontaminasyonu bakımından taşıdığı halk sağlığı risklerini değerlendirmek amaçlanmıştır. Bu amaçla, Afyonkarahisar ilinde satışa sunulan but (20), göğüs (20), kanat (20), taşlık (20) ve karaciğer (20) olmak üzere toplam 100 adet tavuk eti ve sakatat örneği toplanmış ve ISO 6579 referans metodu ile analiz edilmiştir. Bu örneklerden but (1), karaciğer (1) ve kanat (1) olmak üzere toplam 3 (%3) adet *Salmonella* spp. izole edilmiştir ve elde edilen izolatlar PCR ile doğrulanmıştır. Sonuç olarak, Afyonkarahisar'da tüketime sunulan tavuk eti ve sakatatlarında *Salmonella* spp. kontaminasyon düzeyi düşük bulunmasına karşın, tavuk etleri *Salmonella* spp. varlığı açısından önemli bir kaynaktır. Bu nedenle, koruyucu önlemlerin alınması ve tüketicinin gıda güvenliği açısından bilgilendirilmesi önerilmektedir.

Anahtar kelimeler: *Salmonella* spp., tavuk eti, sakatat, hijyen

Presence of *Salmonella* spp. in Chicken Meat and Giblets Marketed in Afyonkarahisar Province

ABSTRACT

Salmonella spp., commonly found in nature and cause infections characterized by peracute septicemia, acute and chronic enteritis in humans and animals, can cause economic concerns due to the rapid transmission tendency among animals. This study aimed to evaluate the public health risks of the chicken meat and giblets marketed in Afyonkarahisar regarding the presence of *Salmonella* spp. For this purpose, totally, 100 chicken meat and giblet samples including drumstick (20), breast meat (20), wing (20), gizzard (20), and liver (20) samples were collected from Afyonkarahisar province and analyzed according to the ISO 6579 reference method. A total of 3 (3%) *Salmonella* spp. were isolated from drumstick (1), liver (1), wing (1) samples and the isolates were confirmed by PCR. In conclusion, although the *Salmonella* spp. contamination level of chicken meat and giblets marketed in Afyonkarahisar province found to be low, chicken meat is an important source for *Salmonella* species. Therefore, it is recommended to take preventive measures and inform the consumer regarding food safety.

Keywords: *Salmonella* spp., chicken meat, giblets, hygiene

To cite this article: Acaröz U, Gürler Z, Kara R, Arslan-Acaröz D, Zemberi F. Afyonkarahisar İlinde Satışa Sunulan Tavuk Eti ve Sakatatlarında *Salmonella* spp. Varlığının Belirlenmesi. Kocatepe Vet J. (2018) 11(4): 414-418.

GİRİŞ

Kanatlı eti, esansiyel aminoasitler, doymamış yağ asitleri, B grubu vitaminler bakımından zengin, bağ doku oranı az, sindirimi kolay ve düşük kalorili hayvansal bir gıdadır (Çalıcıoğlu 2010; Tonbak ve ark. 2017). Kanatlı eti (özellikle piliç eti) üretimi ve tüketimi, sağlıklı bir içeriğe sahip olması, kırmızı ete oranla ekonomik olması, hazırlama kolaylığı gibi nedenlerle Türkiye’de ve dünya genelinde bir artış göstermektedir (Keskin ve Demirbaş 2012; Dokuzlu ve ark. 2013). Bununla birlikte, kanatlı eti mikroorganizmaların üremeleri için de yüksek besin değerinden dolayı oldukça uygun bir ortamdır (Tonbak ve ark. 2017). Günümüzde artan kanatlı eti üretimi ve tüketimi belirli halk sağlığı problemleriyle ilişkilendirilmektedir. Bunlardan en yaygın olanlarından biri bakteriyel ve zoonoz bir etken olan *Salmonella* spp.’dir (Oral ve Türkyılmaz 2008; Siriken ve ark. 2015). Tüketime sunulan tavuk karkaslarının ve parça etlerin elde edilmesi sırasında uygulanan iç organların çıkarılması, soğutma, paketlenme, transport gibi aşamalar bu bakterilerin kontaminasyonu açısından potansiyel bir risk oluşturmaktadır. Gelişen ve gelişmekte olan ülkelerde gıda kaynaklı enfeksiyonların en önemli nedenlerinden biri olan *Salmonella* etkenleri yüksek morbiditeye sahip ve birçok gıda ile ilişkilendirilmekte olup, bu bakterinin neden olduğu Salmonelloz önemli bir halk sağlığı problemidir (de Freitas ve ark. 2010; Abd-Elghany ve ark. 2015). İnsan salmonelloz salgınları, sıklıkla çiğ ve az pişirilmiş kanatlı eti, ürünleri ve yumurta tüketimiyle ilişkilendirilmektedir (Iseri ve Erol 2010). Halk sağlığı için oluşturacağı potansiyel tehlikelerden dolayı kanatlı etlerinin ve ürünlerinin *Salmonella* varlığı yönünden kontrolü önem arz etmektedir. Türkiye’de (Dümen ve ark. 2015; Al ve ark. 2016; Goncuoğlu ve ark. 2016) ve diğer ülkelerde (Jerngklinchan ve ark. 1994; Van Nierop ve ark. 2005; Abd-Elghany ve ark. 2015) tavuk eti ve sakatatlarında *Salmonella* spp. varlığını araştıran çalışmalarda bu etkenin önemli bir bakteriyel kontaminasyon kaynağı olduğu görülmektedir. Bu çalışmada, Afyonkarahisar ilinde tüketime sunulan tavuk etleri ve sakatatlarının önemli gıda kaynaklı bir zoonoz olan *Salmonella* spp. varlığı yönünden klasik kültür metodu ve PCR metodu kullanılarak incelenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada Afyonkarahisar ilinde satışa sunulan kanatlı eti ürünlerinde *Salmonella* türlerinin varlığını belirlemek amacıyla Haziran-Aralık 2017 tarihleri arasında toplanan beş farklı kanatlı eti ürününe (taşlık, karaciğer, but, göğüs eti, kanat) ait

örneklerden 20’şer adet olmak üzere toplam 100 örnek analiz edilmiştir.

Her bir kanatlı eti ve sakatat örneğinden 25 g tartılarak üzerine 225 ml tamponlanmış peptonlu su ilave edildi. Numuneler stomacherde homojenize edilerek $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 18 ± 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra, ön zenginleştirme sıvısından sırasıyla 0,1 ml ve 1 ml alınarak Rapoport Vasilliadis Soya Pepton Broth'a ve Muller-Kauffmann Tetrathionate-novobiocin Broth'a aktarıldı. Besiyerleri sırasıyla $41,5\pm 1^{\circ}\text{C}$ ve $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 ± 3 saat inkübe edildi. Bu aşamadan sonra, selektif besiyerlerinden alınan örnekler Xylose-Lysine-Deoxycholate Agar ve Modified Brilliant Green Agar'a çizildi ve $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 ± 3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra *Salmonella* şüpheli koloniler Tryptone Soya Agar üzerine çizilerek saflaştırıldı. Daha sonra, izole edilen kolonilere biyokimyasal ve serolojik testler uygulandı (Anonim 2002).

Elde edilen *Salmonella* spp. şuşlarının DNA'sı ticari DNA izolasyon kiti (Qiagen DNeasy® DNA İzolasyon Kiti, Almanya) kullanılarak, üretici firma talimatlarına göre ekstrakte edildi. Ekstrakte edilen DNA'lar agaroz jelde görüntülenerek, DNA absorbansları Multiskan™ FC Mikroplate Fotometre (Thermo, ABD) cihazında μDrop spektrofotometride ölçüldü. Primer tasarımında *Salmonella* spp.'e özgü *invA* genine ait DNA dizisine göre tasarlanan primerler (Forward: GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGCAA; Reverse: TCATCGCACCGTCAAAGGAACC) kullanıldı (Yuan ve ark. 2009). PCR karışımı her bir örnek için DNA (2 μl), primerler (0,2 μM), MgCl_2 (1,5 mM), 10x buffer solüsyonu, dNTPler (0,2 mM) ve 3U Platinum Taq DNA Polimeraz 25 μl 'lik final hacimde olacak şekilde hazırlandı.

PCR işlemi T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, ABD) kullanılarak aşağıda belirtilen koşullarda gerçekleştirildi;

-Ön denatürasyon 95°C , 3 dk	} 40 döngü
-Denatürasyon 95°C , 30 sn	
-Primer yapışması 60°C , 30 sn	
-Uzatma 72°C , 30 sn	
-Son uzatma basamağı 72°C , 5 dk	

PCR ürünleri ve marker %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek UV altında görüntüledi.

BULGULAR

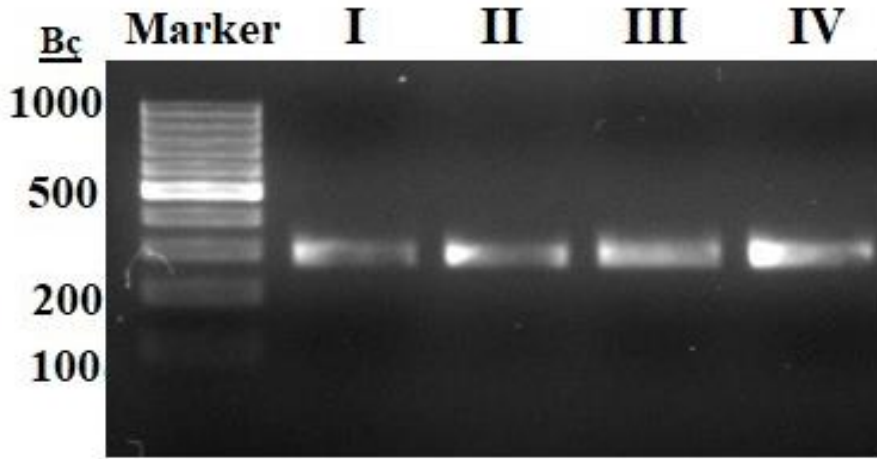
Yapılan çalışmada toplanan parça tavuk eti örneklerinden kanat eti, but eti ve karaciğer örneklerinde 1'er adet *Salmonella* spp. izole edilmiş

olup; toplamda 100 parça tavuk eti örneğinde 3 (%3) adet *Salmonella* spp. tespit edildi. Analiz edilen parça tavuk eti örneklerinden (kanat eti, göğüs eti, but eti, karaciğer, taşlık) izole edilen *Salmonella* spp.

sayıları Tablo 1'de gösterildi. Biyokimyasal ve serolojik testler ile doğrulanan izolatlar PCR ile onaylandı (Şekil 1).

Tablo 1. Analiz edilen tavuk eti ve sakatatlarında *Salmonella* spp. varlığı
Table 1. Presence of *Salmonella* spp. in the analyzed chicken meat and giblets

Numune	Numune Sayısı	Pozitif Numune Sayısı (%)
Tavuk Kanat Eti	20	1 (%5)
Tavuk Göğüs Eti	20	-
Tavuk But Eti	20	1 (%5)
Tavuk Karaciğer	20	1 (%5)
Tavuk Taşlık	20	-
Toplam	100	3 (%3)



Şekil 1. *Salmonella* spp. pozitif örneklerin PCR sonuçları (I: Pozitif Kontrol, II: Kanat, III: But, IV: Karaciğer)
Figure 1. PCR results of *Salmonella* spp. positive samples (I: Positive Control, II: Wings, III: Drumstick, IV: Liver)

TARTIŞMA

En önemli patojen bakterilerden biri olan *Salmonella*, gıda kaynaklı hastalık ve salgınlara neden olabilmektedir (Gouws ve ark. 1998). Dünyada en çok tüketilen hayvansal ürünler arasında olan kanatlı eti ve ürünleri insan salmonellozu'nun en önde gelen sebebidir (Gupta ve ark. 1999; Al ve ark. 2016). Türkiye'de ve dünyada kanatlı eti ve sakatatlarında *Salmonella* spp. varlığını araştıran pek çok çalışma yapılmıştır. Cetinkaya ve ark. (2008) Bursa ilinde marketlerde satışa sunulan 168 adet parça tavuk eti örneğinin sadece %0,6 oranında *Salmonella* spp. ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada, Aydın ve İzmir illerinde bulunan broyler ve broyler damızlık işletmelerinden salmonellosis şüpheli 422 kanatlıya ait karaciğer ve kalp örneklerinde sırasıyla %2,4 ve

%1,7 oranında *Salmonella* spp. izole edildiği bildirilmiştir (Oral ve Türkyılmaz 2008). Ozbey ve Ertas (2006), Elazığ ilindeki bir kesimhaneden temin ettikleri toplam 250 adet tavuğa ait karaciğer örneklerinin *Salmonella* spp. kontaminasyon düzeyini %4 olarak bildirmişleridir. Sezen (2009) İstanbul piyasasında ambalajlı olarak tüketime sunulan 50 adet piliç but ve 50 adet piliç kanat örneğinin *Salmonella* spp. kontaminasyon seviyesini sırasıyla %6 ve %2 olarak belirlemiştir. İstanbul'da yapılan başka bir çalışmada ise tüketime sunulan 50 adedini süpermarketlerden, 50 adedi ise kasaplardan toplanan 100 çiğ tavuk karkasında *Salmonella* spp. kontaminasyon düzeyi %15 olarak belirlenmiştir (Dümen ve ark. 2015). Al ve ark. (2016) 50 karaciğer ve 42 taşlık olmak üzere toplam 92 kanatlı sakatatındaki *Salmonella* spp. kontaminasyon düzeyini sırasıyla %27 ve %18

olarak belirlemişlerdir. Goncuoglu ve ark. (2016) Ankara'da satışa sunulan her birinden 110 adet olmak üzere broyler karkasları, kanat ve karaciğer örneklerindeki *Salmonella* spp. kontaminasyon düzeyini sırasıyla %25,4, %28,1 ve %33,6 olarak bildirmişlerdir. Ankara'da gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise 50 adet poşetlenmiş bütün tavuk karkasına ait olan but ve göğüs örneklerinin *Salmonella* spp. bakımından incelenmiş ve kontaminasyon düzeyi butlarda %18, göğüs örneklerinde ise %16 düzeyinde belirlenmiştir (Efe ve Gümüşsoy 2005). Konya'da tüketime sunulan 168 tavuk karkaslarında yapılan bir çalışmada ise bu bakteri için kontaminasyon düzeyi %32,7 olarak bildirilmiştir (Hadimli ve ark. 2006). Samsun'da süpermarketlerden temin edilen 75 karkas ve 75 parça et olmak üzere toplam 150 adet tavuk eti klasik kültür metodu ve immunomagnetik separasyon metodu kullanılarak *Salmonella* spp. varlığı yönünden incelenmiş olup, klasik kültür metoduna göre kontaminasyon düzeyi %25,3 olarak belirlenirken, immunomagnetik separasyon tekniğine göre kontaminasyon düzeyi %36 olarak belirlenmiştir (Siriken ve ark. 2015). Tokat'ta tüketime sunulan 25 adet tavuk göğsü ve 25 adet tavuk butlarının *Salmonella* spp. kontaminasyon düzeyi sırasıyla %44 ve %52 olarak bildirilmiştir (Yıldırım ve ark. 2015). Bununla birlikte, diğer ülkelerde de *Salmonella* türlerinin kanatlı eti ve sakatatlarında varlığını inceleyen çok sayıda araştırma mevcuttur. Brezilya'da yapılan bir çalışmada 127 tavuk karkası örneğinin hiçbirinin *Salmonella* spp. ile kontamine olmadığını bildirilmiştir. Bununla birlikte bu bakteri için 73 sakatat örneğindeki (kalp, taşlık ve karaciğer) kontaminasyon düzeyi %2,74 olarak bildirilmiştir (de Freitas ve ark. 2010). Arjantin'de yapılan bir çalışmada ise 62 kanatlı sakatat örneğinin kontaminasyon düzeyi %3,2 olarak bildirilmiştir (Favier ve ark. 2013). Rodrigo ve ark. (2006) Trinidad'da yaptıkları bir çalışmada tavuk karkas, taşlık, karaciğer ve kalp örneklerindeki *Salmonella* kontaminasyon düzeyini sırasıyla %7,3, %2,1 ve %1 olarak belirlemişlerdir. Güney Afrika'da taze ve dondurulmuş tavuk karkaslarında gerçekleştirilen bir çalışmada *Salmonella* kontaminasyon düzeyi %19,2 olarak bildirilmiştir (Van Nierop ve ark. 2005). Abd-Elghany ve ark. (2015) Mısır'da yapmış oldukları çalışmada tavuk karkasları, bageet, karaciğer ve taşlıkta *Salmonella* spp. kontaminasyon düzeyini sırasıyla %16, %28, %32 ve %60 olarak saptamışlardır. Tayland'da gerçekleştirilen bir çalışmada ise 705 tavuk eti örneğinin *Salmonella* kontaminasyon düzeyi %66 olarak belirlenirken, 221 sakatat örneğinin kontaminasyonunu %86 olarak bildirilmiştir (Jerngklinchan ve ark. 1994). Dünyada ve Türkiye'de tavuk eti ve sakatatlarında yapılan çalışmalarda farklı oranlarda *Salmonella* spp.

varlığı rapor edilmiş olup çalışmamızda elde edilen sonuçlar bu oranlar arasında bulunmaktadır. *Salmonella* spp. kontaminasyon düzeyindeki farklılıklara hayvanların beslenme, nakliye ve kesim koşulları ile örnek alma, örnek sayısı ve büyüklüğündeki değişkenlikler neden olabilmektedir. Sonuç olarak, Afyonkarahisar'da satışa sunulan kanatlı eti ve sakatatlarında *Salmonella* spp.'nin (%3) yaygın olarak bulunmadığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, kanatlı etlerinin *Salmonella* spp. varlığı açısından önemli bir kaynak olduğu göz önüne alındığında, etkenin kanatlı etlerinden bu patojenin eliminasyonu için, öncelikle tüm üretim prosesinde çiftlikten çatala prensibi ile HACCP, GMP ve GHP sistemlerinin eksiksiz ve düzenli bir şekilde uygulanması, çapraz kontaminasyonun engellenmesi, tüketicilerin bilinçlendirilmesi, risk grubu gıdaların periyodik düzenli kontrollerinin yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abd-Elghany SM, Sallam KI, Abd-Elkhalek A, Tamura T.** Occurrence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from chicken meat and giblets. *Epidemiol. Infect.* 2015;143(5): 997–1003.
- Al S, Hizlisoy H, Onmaz NE, Yildirim Y, Gönülalan Z.** Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, and Typhi isolated from chicken eggs and poultry products. *TURKISH J. Vet. Anim. Sci.* 2016;40(6): 737–43.
- 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.
- Çalıcıoğlu M.** Kesimhanede *Salmonella* Kontrolü: Uygulamalar ve Pratik Yaklaşımlar. *Türkiye Klin. J Vet Sci.* 2010;1(298–104).
- Cetinkaya F, Cibik R, Ece Soyutemiz G, Ozakin C, Kayali R, Levent B.** Shigella and *Salmonella* contamination in various foodstuffs in Turkey. *Food Control.* 2008;19(11): 1059–63.
- Dokuzlu S, Ş OB, Hecer C, Ş MG.** Türkiye 'de Tavuk Eti Tüketim Alışkanlıkları ve Marka Tercihleri. *J. Agric. Fac. Uludag Univ.* 2013;92(2): 83–92.
- Dümen E, Aydın A, Issa G.** Çiğ Tavuk Karkaslarından İzole Edilen *Salmonella*

- Typhimurium, Salmonella Enteritidis ve Salmonella spp.'nin Prevalans, Serolojik Tiplendirme ve PCR Hassasiyetinin Karşılaştırılması. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. 2015;21(5): 653–8.
- Efe M, Gümüşsoy KS.** Ankara Garnizonu'nda tüketime sunulan tavuk etlerinin mikrobiyolojik analizi. Sağlık Bilim. Derg. J. Heal. Sci. 2005;14(3): 151–7.
- Favier GI, Lucero Estrada CSM, Lazarte Otero V, Escudero ME.** Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization by PCR and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) of Salmonella spp. isolated from foods of animal origin in San Luis, Argentina. Food Control. Elsevier Ltd; 2013;29(1): 49–54.
- de Freitas CG, Santana ÂP, da Silva PHC, Gonçalves VSP, Barros M de AF, Torres FAG, Murata LS, Perecmanis S.** PCR multiplex for detection of Salmonella Enteritidis, Typhi and Typhimurium and occurrence in poultry meat. Int. J. Food Microbiol. Elsevier B.V.; 2010;139(1–2): 15–22.
- Goncuoglu M, Ormanci FSB, Uludag M, Cil GI.** Prevalence and Antibiotic Resistance of Salmonella SPP. and Salmonella Typhimurium in Broiler Carcasses Wings and Liver. J. Food Saf. 2016;36(4): 524–31.
- Gouws PA, Visser M, Brozel VS.** A polymerase chain reaction procedure for the detection of Salmonella spp. within 24 hours. J. Food Prot. 1998;61(8): 1039–42.
- Gupta V, Ray P, Sharma M.** Antimicrobial resistance pattern of Shigella and non-typhi Salmonella isolated from patients with diarrhoea. Indian J. Med. Res. 1999;109: 43–5.
- Hadimli HH, Erganiş O, Güner A, Öztürk D, Kav K.** Konya İlinde Perakende Satışa Sunulan Tavuk Etlerinde Salmonella Spp. ve Campylobacter Spp. Varlığı'nın Araştırılması. Vet. Bilim. Derg. 2006;22(3–4): 31–4.
- Iseri O, Erol I.** Incidence and antibiotic resistance of Salmonella spp. in ground turkey meat. Br. Poult. Sci. 2010;51(1): 60–6.
- Jerngklinchan J, Koowatananukul C, Daengprom K, Saitanu K.** Occurance of Salmonellae in Raw Broilers and Their Products in Thailand. J. Food Prot. 1994;57(9): 808–10.
- Keskin B, Demirbaş N.** Türkiye'de Kanatlı Eti Sektöründe Ortaya Çıkan Gelişmeler: Sorunlar ve Öneriler. J. Agric. Fac. Uludag Univ. 2012;26(1): 117–30.
- Oral Aİ, Türkyılmaz S.** Broyler İç Organlarından Salmonella enterica subsp . enterica serovar Enteritidis ' in İzolasyonu ve İzole Edilen Suşların Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg. 2008;5(1): 27–33.
- Ozbey G, Ertas HB.** Salmonella Spp . Isolation From Chicken Samples and Identification By Polymerase Chain Reaction. Bulg. J. Vet. Med. 2006;9(1): 67–73.
- Rodrigo S, Adesiyun A, Asgarali Z, Swanston W.** Occurrence of selected foodborne pathogens on poultry and poultry giblets from small retail processing operations in Trinidad. J. Food Prot. 2006;69(5): 1096–105.
- Sezen G.** Piyasada Satışa Sunulan Taze Kanatlı Eti Preparatlarının Son Kullanma Tarihlerindeki Duyusal, Kimyasal ve Mikrobiyolojik Kaliteleri. Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med. 2009;28(1): 19–24.
- Siriken B, Türk H, Yıldırım T, Durupinar B, Erol I.** Prevalence and characterization of salmonella isolated from chicken meat in Turkey. J. Food Sci. 2015;80(5): M1044–50.
- Tonbak F, Atasever M, Çalıcıoğlu M.** Kanatlı Etlerinde Salmonella Riski. Atatürk Üniversitesi Vet. Bilim. Derg. 2017;12(1): 90–8.
- Van Nierop W, Dusé AG, Marais E, Aithma N, Thothobolo N, Kassel M, Stewart R, Potgieter A, Fernandes B, Galpin JS, Bloomfield SF.** Contamination of chicken carcasses in Gauteng, South Africa, by Salmonella, Listeria monocytogenes and Campylobacter. Int. J. Food Microbiol. 2005;99(1): 1–6.
- Yıldırım Z, Ceylan Ş, Öncül N.** Tokat Piyasasında Satışa Sunulan Tavuk Etlerinin Mikrobiyolojik Kalitesinin Belirlenmesi. Akad. Gıda. 2015;13(4): 304–3016.
- Yuan Y, Xu W, Zhai Z, Shi H, Luo Y, Chen Z, Huang K.** Universal primer-multiplex pcr approach for simultaneous detection of escherichia coli, listeria monocytogenes, and salmonella spp. in food samples. J. Food Sci. 2009;74(8).

Postpartum Nonsiklik Sütçü İneklerde Progesteron-Östradiol, Progesteron-GnRH-Prostaglandin F_{2α} veya Östradiol ile Tedaviden Sonra Folliküler Değişiklikler ve Reprodüktif Performans[#]

Hasan Basri TEK*, Yavuz NAK, Ahmet GÜMEN, Kamil SEYREK-İNTAŞ, Abdülkadir KESKİN

Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye

[#]Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından V-2004/32 nolu proje ile desteklenmiştir.

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

ÖZ

Çalışmanın amacı; postpartum nonsiklik ineklerde progesteron, GnRH, PGF_{2α} ve östradiol benzoat hormonlarını içeren tedavi yöntemlerinin folliküler gelişim ve progesteron konsantrasyonları üzerindeki etkilerini araştırmaktır. Çalışma materyalini tedavi yöntemlerine göre rastgele 3 gruba ayrılan toplam 20 adet nonsiklik Holstein inek oluşturdu (n=20). Grup I' de (n=7) bulunan ineklere 12 gün süre ile PRID (östradiol kapsüllü) yerleştirildi. Grup II' de (n=6) 0. günde 10 mcg GnRH ve PRID (kapsülsüz) ve PRID' lerin uzaklaştırıldıkları 7. günde 25 mg PGF_{2α} tedavileri uygulandı. Grup III' de (n=7) ise grup II' den farklı olarak kapsülsüz PRID' lerin uzaklaştırılmalarını takiben 10. saatte östradiol benzoat uygulandı. Sıfırıncı günde GnRH uygulamalarına cevap olarak grup II (6/6) ve III' de (5/7) bulunan ineklerde sırasıyla ortalama 2,5±0,2. ve 2,2±0,2. günlerde; 12,0±0,7 mm ve 11,0±0,9 mm çaplı folliküllerde ovulasyonlar tespit edildi. PRID' lerin vaginadan uzaklaştırılmalarını takiben grup I' de bulunan ineklerde (7/7) persistent follikül oluşumu gözlenirken, Grup II (4/6) ve III' de (6/7) yer alan ineklerde 4,8±0,6. ve 3,5±0,3. günde ovulasyonlar tespit edildi. Sonuçta; Grup I' de uygulanan tedavi, siklik aktivitenin başlatılmasında başarısız kaldı ve persistent follikül oluşumuna neden oldu. Grup II ve III' de uygulanan tedaviler siklik aktivitelerin başlatılmasında benzer başarıyı gösterirken, östradiol benzoat tedavisine bağlı olarak Grup III' de ovulasyonlar daha erken gözlemlendi (P<0,05).

Anahtar Kelimeler: Nonsiklik inek, PRID, folliküler dalga, persistent follikül

Follicular Changes and Reproductive Performance in Postpartum Noncyclic Dairy Cows After Treatment with Progesterone and Estradiol or with Progesterone, GnRH, Prostaglandin F_{2α} and Estradiol

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of treatment methods including GnRH, PGF_{2α} and estradiol hormones on follicular development and progesterone concentrations in postpartum noncyclic cows. The study material consisted of 20 noncyclic, Holstein breed cows (n= 20), which were randomly allocated to three groups according to the treatment protocols. In Group I (n=7), PRID with estradiol capsule was inserted for 12 d. Cows in Group II (n=6) were treated with 10 mcg of GnRH and PRID without estradiol capsule on Day 0 and 25 mg of PGF_{2α} on Day 7 when PRID was removed. Cows in Group III (n=7) were treated same as Group II until PRID removal, then they were received estradiol benzoate 10 h after PRID removal. In response to GnRH treatment on Day 0, all six cows in Group II and 5 of 7 cows in Group III ovulated 2,5±0,2 d and 2,2±0,2 d after GnRH treatment with 12,0±0,7 mm and 11,0±0,9 mm follicle diameter. All cows (7/7) in Group I had a persistent follicles on the ovary following 12 d PRID treatment. Ovulations after PRID removal were detected on Day 4,8±0,6 and 3,5±0,3 d in Group II(4/6) and III (6/7), respectively. In conclusion, PRID (with capsule) treatment for 12 d was not successful to resume cyclicity and cause persistent follicle in noncyclic cows. However, resumption of cyclicity was similarly high in Group II and III in response to treatments. In addition, cows in Group III ovulated earlier than Group II due to estradiol benzoate treatment (P<0.05).

Keywords: Noncyclic cows, PRID, follicular wave, persistent follicle

To cite this article: Tek H.B. Nak Y Gümen A. Seyrek-İntaş K. Keskin A. Postpartum Nonsiklik Sütçü İneklerde Progesteron-Östradiol, Progesteron-GnRH-Prostaglandin F_{2α} veya Östradiol ile Tedaviden Sonra Folliküler Değişiklikler ve Reprodüktif Performans. Kocatepe Vet J. (2018) 11(4): 419-429.

GİRİŞ

Süt sığırı yetiştiriciliğinin başarısını belirleyen en önemli faktörlerden birisi de, üreme ile ilgili faaliyetlerin düzeyidir. Üreme ile ilgili olumsuzluklar ve aksaklıklar, sağılmakta olan inek sayısını doğrudan etkilemektedir. Böylece buzağılamalar arasındaki süre uzayarak laktasyon sayısı yani bir ineğin yaşamı boyunca ürettiği toplam süt miktarı azalmaktadır. Bunun yanında üreme; genetik ilerleme ve seleksiyon konusunda belirleyici rol oynayan temel faktörler arasındadır (Peter ve Lamming 1990, Mongiardino ve ark. 1990).

Bir işletmede gerek döl verimi ve gerekse süt verimi açısından en iyi düzeye ulaşmak amacıyla, her inek için yılda bir buzağı elde edilmesi gerektiği birçok araştırmacı tarafından bildirilmektedir. (Alaşam 1992, Yavas ve Walton 2000, Rhodes ve ark. 2003). Bu amaca ulaşmak için, bir ineğin doğumunu izleyen 75–85. günler arasında gebe kalması ve postpartum anöstrus süresinin fizyolojik sınır olan 60 günü aşmaması gerektiği bilinmektedir (Yavas ve Walton 2000, Rhodes ve ark. 2003, Mwaanga ve Janowski 2000, Roche ve ark. 2000).

Yıl boyu buzağılamaların gözleendiği süt sığırcılığı işletmelerinde, postpartum 44. güne kadar ovulasyonların gözlenmemesi “uzamış postpartum süreç” olarak tanımlanmaktadır. Bu hayvanlar buzağılama sonrası 44. günden önce ovulasyon gösterenler ile karşılaştırıldığında ilk tohumlamadaki gebe kalma oranının daha düşük ve gebelik başına düşen tohumlama sayısının ise daha yüksek olduğu belirtilmektedir (Lamming ve Darwash 1998).

Erken postpartum dönemde anovulatör anöstrus problemi bulunan sütçü ineklerde negatif enerji dengesinin şiddeti ile bağlantılı olarak, preovulatör gonadotropinlerin yetersiz salınımları gerçekleşmektedir. Ovulasyonu uyuracak yeterli düzeyde dominant follikül kaynaklı östradiol üretiminin sağlanamaması, dominant follikül atrezisinin temel nedeni olarak gösterilmektedir. Sonuç olarak; yapılan çalışmalar “anovulatör anöstrus”un nedeninin, doğum sonrası dönemde ovaryumlar üzerinde dominant folliküllerin bulunmamasından değil bu folliküllerin ovule olmamalarından kaynaklandığını ortaya koymuştur (Roche ve ark. 1988, Roche ve ark. 2000).

Siklik veya anöstrustaki ineklerde yeni bir follikül dalgasının uyarılması, östrus ve ovulasyonun senkronizasyonu amacıyla ekzojen doğal progesteron içeren vagina içi alet (PRID / CIDR-B) veya progestagen içeren kulak implantlarının kısa veya uzun süreli olarak uygulamalarını içeren hormonal tedavi programlarında, olası bir endojen

progesteron kaynağının [Korpus Luteum (CL)] ortadan kaldırılmasına yönelik, progesteron / progestagen kaynaklarının uzaklaştırılmasından 1 gün önce veya uzaklaştırma anında prostaglandin F2 alfa (PGF_{2α}) analogları kullanılmaktadır (Rhodes ve ark. 2003, Fike ve ark. 1997, Xu ve ark. 2000a, Xu ve ark. 2000b, Ryan ve ark. 1999, Stevenson ve ark. 2000).

Ayrıca, nonsiklik ineklerde tedavi başlangıcında Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) ve 7 gün süre ile CIDR uygulamaları, CIDR’lerin uzaklaştırma gününde veya bir gün öncesinde PGF_{2α} ve CIDR’lerin uzaklaştırılmalarından 10 saat veya bir gün sonrasında östradiol benzoat uygulamaları şeklindeki hormonal yöntemler ile, yeni bir follikül dalgası geliştirilerek anovulatör bir dominant follikülün ovule edilebileceği ve böylece fertil bir ovulasyonun uyarılabileceği ifade edilmektedir (Rhodes ve ark. 2003, Fike ve ark. 1997, Xu ve ark. 2000a, Xu ve ark. 2000b, Ryan ve ark. 1999).

Sığır hekimliğinde ticari kullanım için sunulan progestin preparatları, ovaryumlar üzerinde dominant folliküllerin daha büyük boyutlara ulaşmasına ve uzun bir zaman periyodunca kalıcı olmasına neden olabilir (Sirois ve Fortune 1990, Savio ve ark. 1993, Stock ve Fortune 1993, Lucy ve ark. 1990, Rajamahendran ve Taylor 1991, Cupp ve ark. 1992, Taylor ve ark. 1993, Mihm ve ark. 1994). Sığırlarda siklusun luteal fazı sırasında progesteron konsantrasyonu ovaryum folliküler dinamiklerinin sağlıklı bir şekilde devamlılığı açısından gereklidir (Lucy ve ark. 1992). Persistent ovaryum folliküllerinin gelişimi, özellikle tedavi periyodunun büyük bir bölümünde CL yokluğunda östrus senkronizasyonu amacıyla kullanılan progestinlerin tedavi dozlarının bir sonucu olarak meydana gelir (Savio ve ark. 1993, Sanchez ve ark. 1995).

Farklı çalışmalarda (Mihm ve ark. 1994, Ahmad ve ark. 1995) elde edilen sonuçlara göre; persistent folliküllerin ovulasyonu ile elde edilen düşük fertilitenin en muhtemel nedeni anormal oosit gelişimidir. Persistent folliküllerdeki ve normal gelişim sürecine sahip dominant folliküllerdeki oositlerin fertilizasyon oranları benzer olmasına karşılık, persistent folliküllü sığırlardaki erken embriyonik ölüm oranı daha büyük bir paya sahiptir. Bunun muhtemel nedeni ise persistent folliküllerdeki yaşlanmış oositlerin ovulasyonu olabilir (Mihm ve ark. 1994, Ahmad ve ark. 1995). Sunulan çalışmada, postpartum nonsiklik ineklerde progesteron, GnRH, PGF_{2α} ve östradiol benzoat gibi hormonları içeren farklı tedavi yöntemlerinin folliküler gelişim ve progesteron konsantrasyonları üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Hayvan Materyali ve Tedavi Grupları

Bu çalışmada, Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü-Bursa Karacabey Tarım İşletmesi'nde bulunan ve işletme kayıtlarına göre doğum sonrası en az 44. günden itibaren hiç östrus göstermemiş 102 baş Holstein ırkı siyah-alaca inek belirlendi. Yapılan muayeneler sonrası bu inekler içerisinde tespit edilen 20 baş nonsiklik inek çalışma materyalini oluşturdu. Doğum sonrası 44. günden itibaren hiç östrus göstermeyen tüm inekler için ilk kez muayenelerin yapıldığı gün -11 (tedavi başlangıcından 11 gün önce) ve çalışmada yer alacak inekler için tedavi başlangıç günü 0. gün olarak kabul edildi. Yapılan ultrasonografik (USG) ve rektal muayenelerin (-11, -2 ve 0. Günlerde) en az birisinde ovaryumlar üzerinde CL tespit edilen inekler siklik olarak değerlendirildi ve çalışma içerisinde yer almadı. Her üç muayenede de CL tespit edilmeyen ve muayenelerin yapıldığı günlerdeki serum progesteron değerleri 1 ng/mL' den düşük olan inekler sahip oldukları follikül büyüklüklerine göre; 25 mm' den küçük olanlar (nonsiklik) ve 25 mm'den büyük ve 10 günden daha uzun süre kalıcı olanlar (folliküler kistli) olarak ayrıldı.

Kistik ovarian dejenerasyonlu oldukları tespit edilen inekler (n=4) çalışmaya dahil edilmedi. Üç baş nonsiklik inek ise vaginal stenozis ve genital enfeksiyon gibi nedenlerden dolayı tedavi gruplarından çıkartıldı.

Nonsiklik olarak çalışmaya dahil edilen inekler (n=20) 0. günde; Grup I(n=7), Grup II (n= 6) ve Grup III (n=7) arasında rastgele bir şekilde dağıtıldı. Tedavi başlangıç günü, 0. gün olarak kabul edilerek 3 farklı grupta bulunan ineklere aşağıdaki tedaviler uygulandı.

Grup I; sıfıncı günde 1,55 gr progesteron ve 10 mg östradiol benzoat kapsülü içeren PRID (PRID®, Sanofi, Doğu İlaç), 12 gün süre ile vaginaya yerleştirildi.

Grup II; sıfıncı günde 10 mcg bir GnRH analogu olan buserelin asetat (Receptal®, Intervet) kas içi olarak uygulandı ve östradiol benzoat kapsülü içermeyen PRID vaginaya yerleştirildi. Yedinci günde PRID vaginadan uzaklaştırıldı ve 25 mg bir PGF_{2α} analogu olan dinoprost trometamin (Dinolytic®, Pharmacia) kas içi yolla uygulandı.

Grup III; sıfıncı günde 10 mcg GnRH analogu kas içi uygulandı ve östradiol benzoat kapsülü içermeyen PRID vaginaya yerleştirildi. Yedinci günde PRID vaginadan uzaklaştırıldı ve 25 mg PGF_{2α} analogunun kas içi enjeksiyonu yapıldı. İkinci gruptan farklı olarak PRID' in vaginadan uzaklaştırılmasından 10 saat sonra 1 mg östradiol

benzoat (Oestrodol Benzoate®, Intervet) kas içi olarak uygulandı.

Ultrasonografik Muayeneler

PRID' lerin vaginaya yerleştirilmesinden itibaren 24 gün süreyle tüm gruplardaki ineklerin folliküler gelişim ve ovulasyonların izlenmesi amacıyla ovaryumlarının günlük transrektal USG muayeneleri 7.5 MHz' lik transrektal proba sahip ultrasonografi cihazı (DYNAMIC IMAGING, Scotland, İngiltere) kullanılarak yapıldı. Çapı 5 mm ve üzeri olan folliküller ile büyüklükleri göz önüne alınmaksızın tüm CL' ların ovaryumlar üzerindeki konumu ve ölçüleri belirlenip kayıtları tutuldu. CL ve folliküllerin ölçümleri USG ekranında maksimum büyüklüklerinde dondurularak, boyuna ve enine en uzun çaplarının ortalamalarının alınması ile elde edildi. Folliküler deviasyon; en büyük follikül (dominant follikül) ile maksimum çapına ulaşmış olan ikinci en büyük follikül (en büyük subordinate follikül) arasındaki büyüme oranlarında şekillenen en büyük farklılığın başlangıcı olarak tanımlanmıştır (Ginther ve ark. 1997). Buna göre tedavi süresince meydana gelen folliküler dalgalardaki deviasyon günleri belirlendi. Ovaryumlar üzerinde dominantlık süreçleri 10 günü aşan dominant folliküller "persistent dominant follikül" olarak tanımlandı (Diskin ve ark. 2002). Bu tanıma göre, tedavi gruplarında PRID' lerin uzaklaştırılmalarını takiben şekillenen persistent dominant folliküller tespit edildi. Tedavi sırasında ve/veya sonrasında iki ardışık günde yapılan USG muayenelerinde çapı 10 mm' den büyük bir follikülün ortadan kaybolmasının tespit edildiği gün ovulasyon günü olarak kabul edildi ve kaydı tutuldu. Tedavi grubunda yer alan her bir inek için uygulanan hormonal tedavilere yanıt olarak gözlenen ovulasyonlar, yeni bir follikül dalga gelişimi, deviasyon günleri ve PRID' lerin uzaklaştırılmasını takiben meydana gelen ovulasyonlar ve persistent follikül gelişimlerini içeren bireysel follikül gelişim modelleri belirlendi.

Östrus Takibi ve Suni Tohumlama

Tüm gruplarda PRID' lerin uzaklaştırılmasını izleyen 24. saatten başlayarak 144. saate kadar 06.00, 12.00, 18.00 ve 24.00. saatlerinde olmak üzere günde 4 kez, 20' şer dakika sürelerle kızgınlık takip ve tespiti yapıldı. Vulvada ödem ve hiperemi, çara akıntısı ve üzerine başka bir hayvanın atlamasına izin verme (standing refleksi) belirtilerine sahip inekler östrusta kabul edildi. Rektal palpasyon ve USG muayenelerinde ovaryumları üzerinde çapı 10 mm' den büyük follikülü bulunan, uterusu ödemli ve tonusu artmış inekler sun'i tohumlama için ayrıldı. Tohumlamalar davranışsal östrus belirtilerinin tespitinden 12 saat sonra fertilitesi belirlenmiş, dondurulmuş bir sperma ile yapıldı. Buna karşılık davranışsal östrus belirtileri göstermeyenlerde ise PRID' lerin vaginadan

uzaklaştırılmalarını takiben 48. saatte tohumlamalar yapıldı.

Kan Örneklerinin Toplanması ve Progesteron Analizi

Kan örnekleri PRID' lerin yerleştirildiği günden itibaren tüm gruplarda yer alan ineklerden 0, 1, 2, 4, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 16, 18, 21 ve 24. günlerde V. jugularis' ten 10 ml'lik antikoagulan içermeyen vakutainer tüpler (BD Vacutainer Systems, 10 mL, İngiltere) yardımı ile alındı. Toplanan kanlar 3 saat içerisinde santrifüj işlemi (3000 devir / dk, 15 dk süre ile) yapılarak serumları ayrıldı ve eppendorf tüpler içerisinde progesteron analizi yapılabildi kadar - 20 ° C' de derin dondurucuda muhafaza edildi.

Serum progesteron düzeylerinin analizi özel bir laboratuarda direkt solid faz enzimimmunoassay (EIA) (Progesteron ELISA ®, DRG International Inc., USA) yöntemiyle yapıldı.

Gebelik Muayeneleri

Gebelik muayeneleri, sun'i tohumlama sonrası 2 ay süre ile östrus belirtisi göstermemiş ineklerde rektal palpasyon yöntemi ile yapıldı. Kõrnu uterilerde asimetri ve yavru zarı kayması gebelik kriteri olarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Çalışma verilerinin istatistiki analizi; serum progesteron düzeyleri, zaman içerisinde tekrarlanan ölçümlerin değerlendirildiği SAS' ın Mixed Prosedürü kullanılarak yapıldı.

Kullanılan istatistik model; $Y_{ijk} = \mu + trt_i + cow_j + (trt_i) + time_k + trt_i * time_k + e_{ijk}$

Y_{ijk} =progesteron

μ = genel ortalama

trt_i = tedavi gruplarının etkisi (i=1,2,3)

cow_j (trt_i) =ineklerin etkisi (j=1,2,3,4,...20)

$time_k$ =günlerin etkisi (k=1,2,3,...21)

$trt_i * time_k$ = tedavi grupları ile günler arasındaki interaksiyonun etkisi

e_{ijk} =tesadüfî hata

Aynı deneysel ünite, inek_j (trt_i) üzerinde tekrarlanan ölçümlerden dolayı meydana gelen hataları hesaplamak için 1- ko-varyans hata yapısı kullanıldı (Littell ve ark. 1998). Model içerisinde tedavi önemliyse tedaviler arasındaki farklılıklar PDIFF opsiyonu kullanarak belirlendi.

Tedavi periyodunun farklı dönemlerinde (0 ve 7. günlerde) follikül büyüklükleri, preovulatör folliküllerin çapları ve oluşmuş CL çaplarının karşılaştırılmasında student t-test kullanıldı.

Bi nominal veri düzenine uyan gruplarda (GnRH ve/veya PRID tedavileri sonrası) gözlenen ovulasyonlar ve persistent follikül oluşumlarının karşılaştırılmasında Fisher-Exact testi kullanıldı.

Tüm veriler, $X \pm S.E.M.$ ve dağılım aralıkları veya oranlar şeklinde verildi. İstatistiksel analizler $p < 0,05$ önemlilik düzeyinde değerlendirildi.

BULGULAR

Yapılan rektal ve ultasonografik muayeneler sonucunda 102 ineğin 75 başı (% 73,5) siklik, 23 başı (% 22,5) nonsiklik ve 4 başı (%3,9) ise kistik olarak değerlendirildi. Hayvan gruplarında uygulanan tedavilere yanıt olarak ovaryumlardaki folliküller değişiklikler ve ovulasyonlar ile ilgili bilgiler Tablo 1' de verildi.

Follikül Aktivitelerinde Görülen Değişiklikler

Tedavi Başlangıcında Ovaryum Üzerindeki Folliküllerin Büyüklükleri

Tedavi başlangıcında ineklerin ovaryumlarının USG muayenelerinde maksimum çapları 6 ile 15 mm arasında değişen folliküller gözlemlendi. Bu folliküllerin ortalama büyüklükleri Grup I, II ve III'de sırasıyla 9.1 ± 0.9 (6.0-13.0), 12.0 ± 0.7 (9.0-14.0) 11.0 ± 0.9 (7.0-15.0) mm olarak tespit edildi. Gruplar arasındaki en büyük folliküllerin ortalama değerleri istatistiki olarak karşılaştırıldığında; Grup I ve II arasında farklılık gözlenmesine karşılık ($P < 0.05$), Grup III ile I ve II arasında farklılık gözlenmedi.

GnRH Uygulanması Sonrası Ovulasyonlar

PRID' lerin vaginaya yerleştirildiği 0. günde 2 ve 3. gruplara uygulanan GnRH tedavileri sonrasında 2.5 ± 0.2 (2.0-3.0). günlerde Grup II' de yer alan 6 ineğin 6' sında da (% 100) ovulasyonların şekillendiği gözlemlendi. Üçüncü grupta yer alan 7 ineğin 5' inde (% 71,4) ise 2.2 ± 0.2 (2.0-3.0). günlerde ovulasyonlar tespit edildi.

Deviasyon Günleri

Uygulanan tedavilere yanıt olarak yeni oluşan follikül dalgaları içerisindeki ortalama deviasyon günleri; Grup I, II ve III' de sırasıyla 7.1 ± 0.3 (6.0-8.0), 4.5 ± 0.3 (4.0-6.0) ve 4.0 ± 0.2 (3.0-5.0) olarak tespit edildi. Folliküler deviasyon zamanlarının grup I' de yer alan ineklerde, Grup II ve III' te yer alan ineklere göre daha geç meydana geldiği saptandı ($p < 0.0001$). Grup II ve III arasında deviasyon günlerinde farklılık tespit edilmedi.

Deviasyon ile tedavi sonrası şekillenen ovulasyonlar arasında geçen ortalama zaman aralığı Grup II ve III' te 7.0 ± 0.4 (6.0-8.0) ve 6.5 ± 0.4 (5.0-8.0) günler olarak belirlendi.

PRID' lerin Vaginadan Çıkarıldıkları Günlerde Ovaryum Üzerindeki Follikül Büyüklükleri

Grup II ve III' te yer alan inekler için PRID' lerin vaginadan uzaklaştırıldıkları tedavinin 7. gününde ovaryumlar üzerindeki en büyük folliküllerin ortalama çapları; Grup I' de 9.7 ± 0.5 (8.5-12.5), Grup II' de, 11.7 ± 0.7 (10.0-14.0) ve Grup III' de ise 10.9 ± 0.6 (8.0-13.0) mm olarak belirlendi. Bu folliküllerde; Grup I ve II arasında istatistiki farklılık gözlenirken ($P < 0.05$), Grup I -III ve II-III arasında ise farklılıklar tespit edilmedi. Birinci Grup

için PRID' lerin vaginadan uzaklaştırıldıkları 12. günde en büyük folliküllerin ortalama çapları ise 15.1 ± 0.7 (13.0-18.0) mm olarak ölçüldü. Gruplar arasında farklılık tespit edilmedi.

PRID Tedavisi Sonrası Ovulasyonlar ve CL Oluşumu

İkinci Grupta bulunan 6 inekten 4'ünde (%67) PRID' lerin uzaklaştırılmasını takiben ortalama olarak 4.8 ± 0.6 (4.0-7.0) ve Grup III' de yer alan 7 inekten 6'sında (%86) ise, 3.5 ± 0.3 (3.0-5.0). günlerde ovulasyonların meydana geldiği gözlemlendi. Bu ineklerde PRID' lerin uzaklaştırılmalarını takiben tedavilere cevap olarak ovulatör folliküllerin ortalama maksimum büyüklükleri Grup II' de 14.8 ± 1.1 (12.0-17.0) ve Grup III' de 14.3 ± 1.4 (10.0-20.0) olarak tespit edildi. Gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık gözlemlenmedi. Nonsiklik ineklerde uygulanan hormonal tedavilere cevap olarak meydana gelen ovulasyonlar ve CL' lerin 22-24. günlerdeki USG ölçümleriyle tespit edilmiş ortalama maksimum büyüklükleri, Grup II' de yer alan inekler (4/6) için 20.0 ± 0.8 (18.00-22.0) mm ve Grup III inekler (6/7) için ise 25.0 ± 1.2 (21.0-30.0) mm olarak belirlendi.

PRID Tedavisi Sonrası Persistent Dominant Follikül Oluşumu

Birinci grupta yer alan ineklerin hiç birisinde 12 günlük tedavi süresince ve sonrasında ovulasyon gözlemlenmedi. Bu tedavi grubundaki tüm ineklerde (7/7; %100) persistent follikül oluşumu tespit edildi. Sonuç olarak, persistent follikül oluşum oranı Grup I' deki ineklerde Grup II ve III' de yer alan ineklerden daha fazla bulundu ($p < 0.05$).

Progesteron Konsantrasyonları

Tedavi gruplarındaki serum progesteron konsantrasyonları Şekil 1' de gösterilmiştir. Tedavi grubuna girecek ineklerin nonsiklik olduklarını doğrulamak için, doğum sonrası 44. günden itibaren ilk kez muayenelerin yapıldığı ve kan serumlarının alındığı gün, eksi 11 ve çalışmada yer alacak inekler için tedavi başlangıç günü 0. gün olarak kabul edilmek üzere; eksi 11, -2 ve 0. günlerdeki ortalama progesteron konsantrasyonları 0,5 ng/mL ve daha düşük bulundu.

Sıfırıncı günde PRID tedavisine başladıktan sonra tüm gruplarda progesteron değerlerinin hızla artmaya başladığı görüldü. Tedavi gruplarında PRID tedavisi süresince serum progesteron konsantrasyonları yaklaşık olarak 2 ng/mL olarak tespit edildi. Birinci grupta 12 günlük PRID tedavisi başlangıcından itibaren, ilk iki gün içerisinde progesteron konsantrasyonlarının hızla artmaya başladığı belirlenmiştir. Takiben PRID' lerin uzaklaştırılmalarına kadar progesteron konsantrasyonlarının tedavi süresince 1 ng/mL' nin altına düşmeksizin zaman içerisinde azalan bir seyir izlediği belirlendi. PRID' lerin vaginadan

uzaklaştırılmalarını takiben tedavinin 13. gününde serum progesteron konsantrasyonlarının bazal seviyelerine düştüğü ve 24. güne kadar bu seyrini koruduğu saptandı. PRID' lerin uzaklaştırıldığı ve PGF_{2α} enjeksiyonlarının yapıldığı tedavinin 7. gününde, Grup II ve III' de yer alan ineklerde progesteron konsantrasyonları hızla düşmeye başladı. PGF_{2α} tedavisi ile GnRH uygulamalarına yanıt olarak oluşan CL' lerin lize olmaları sağlandı. Endojen (CL) ve ekzojen (PRID) progesteron kaynaklarının uzaklaştırılmaları ile bu gruplarda yer alan ineklerde tedavinin 8. gününde progesteron değerleri 1 ng/mL' nin altına düştüğü gözlemlendi.

İkinci grupta yer alan ineklerde ortalama progesteron konsantrasyonları 9.-16. günler arasında bazal seviyelerinde kalarak 16. günden itibaren ise artmaya başladığı gözlemlendi. Üçüncü grupta bulunan ineklerin progesteron konsantrasyonları ise 9.-12. günler arasında bazal seviyelerinde kaldıktan sonra 13. günden başlayarak arttığı belirlenmiştir. Östradiol benzoat uygulanan Grup III' teki ineklerin ortalama progesteron değerleri tedavinin 16-21. günlerinde Grup I ve II' de yer alan ineklerin değerinden daha yüksek olduğu tespit edildi ($p < 0,05$).

Tedavinin 20. ve 21. günlerinde Grup II' de yer alan ineklerin progesteron değerlerinin Grup I' den daha yüksek olduğu belirlendi ($p < 0,05$).

Reprodüktif Performans

PRID' lerin uzaklaştırılmasını takiben ovulasyonların tespit edilmesine karşılık davranışsal östrus semptomları göstermeyen (sakin kızgınlık) inek sayısı, Grup II için 2/4 (%50) ve Grup III için ise 1/6 (%17) olarak belirlendi. Ovulasyonların gözlemlenmediği grup I' de yer alan ineklerde östrus semptomları tespit edilmedi.

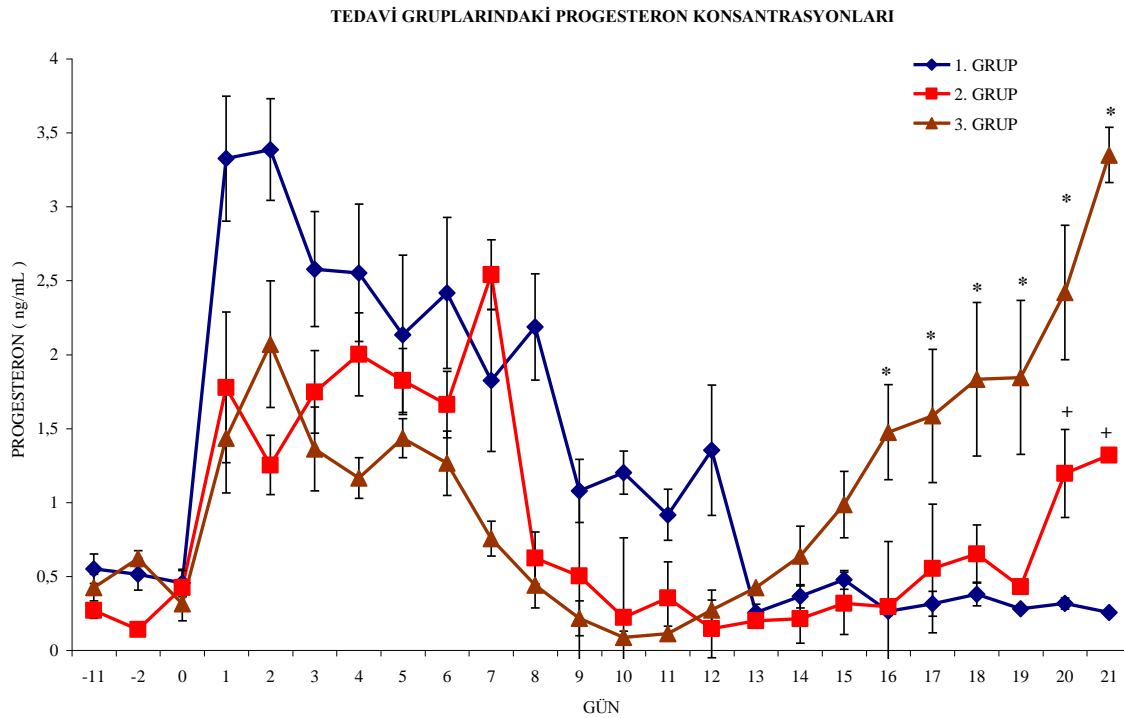
Birinci grupta yer alan ineklerde tedavi sonrasında persistent follikül oluşumunun şekillenmesi ve ovulasyonların gözlenmemesi nedeniyle gebelik elde edilmedi. PRID' lerin uzaklaştırılmaları sonrasında östrus belirtileri göstermelerine bakılmaksızın tohumlamalar sonrasında gebelik oranları Grup II' de % 33 (2/6) ve Grup III' de ise % 43 (3/7) olarak saptandı. İkinci grupta PRID sonrası ovulasyon gözlenen dört inek için gebelik oranı % 50 (2/4) olarak tespit edildi. Gebe olan ineklerden birisinde tohumlama anında kızgınlık belirtileri olmasına karşın diğer inekte ise kızgınlık gözlemlenmedi. Üçüncü grupta ovulasyon tespit edilen 6 inek için gebelik oranı ise % 50 (3/6) olarak belirlendi. Bu grupta gebe olan ineklerde östrus semptomlarının meydana geldiği gözlemlendi.

Bu reprodüktif veriler, hayvan gruplarındaki denek sayılarının yetersizliği nedeniyle istatistiksel olarak değerlendirilmeyip sadece bilgi niteliğinde verilmiştir.

Table 1. Tedavi gruplarındaki ineklerin ovaryum follikül ölçümlerine ve reproduktif parametrelerine ait bilgiler.
Table 1. The informations on ovarian follicle measurements and reproductive parameters of the cows in treatment groups

	1. Grup	2. Grup	3. Grup
İnek Sayısı (n)	7	6	7
0. Günde En Büyük Folliküllerin Ortalama Çapları (mm)	9.1±0.9 ^a	12.0±0.7 ^b	11.0±0.9 ^{a,b}
GnRH Uygulama Sonrası Ovulasyon Gösteren İnek Sayısı	-	6 / 6	5 / 7
GnRH Sonrası Ortalama Ovulasyon Zamanı (Gün)	-	2.5±0.2	2.2±0.2
Oluşan Follikül Dalgalarındaki Ortalama Deviasyon Zamanı (Gün)	7.1±0.3 ^c	4.5±0.3 ^d	4.0±0.2 ^d
7.Günde DF' lerin Ortalama Maksimum Büyüklükleri (mm)	9.7±0.5 ^a	11.7±0.7 ^b	10.9±0.6 ^{a,b}
12. Günde DF' lerin Ortalama Maksimum Büyüklükleri (mm)	15.1±0.7	-	-
Ovulatör Folliküllerin Ortalama Maksimum Büyüklükleri (mm)	-	14.8±1.1	14.3±1.4
Ortalama Deviasyon – Ovulasyon Zaman Aralığı (Gün)	-	7.0±0.4	6.5±0.4
PRID Sonrası Ovulasyon Sayısı	-	4 / 6	6 / 7
Ortalama PRID - Ovulasyon Zaman Aralığı (Gün)	-	4.8±0.6	3.5±0.3
22-24. Günlerdeki Ortalama Maksimum CL Büyüklüğü (mm)	-	20.0±0.8	25.0±1.2
Ovulasyonlu Sakin Kızgınlık Sayısı	-	2 / 4	1 / 6
Persistent Follikül Oluşan İnek Sayısı	7 / 7 ^a	2 / 6 ^b	1 / 7 ^b
Gebe İnek Sayısı	-	2 / 6	3 / 7

a,b p<0.05; c,d p<0.0001



Şekil 1. Tedavi gruplarında yer alan nonsiklik ineklerin progesteron konsantrasyonları (X±SD). (*) Grup III ile I ve II, (+) Grup I.ve II. arasındaki fark (p<0,05).

Figure 1. Progesterone concentrations of the noncyclic cows in treatment groups (X±SD). (*)Difference between Groups III and I,II (+) Difference between Group I.and II.(p<0,05).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Buzağılamalar arasındaki sürenin uzaması ile sonuçlanan uzamış postpartum anöstrus süreci, süt sığırcılığı ile uğraşan işletmeler için ileri düzeyde

ekonomik kayıplara neden olan önemli bir infertilite nedenidir. Bu çalışmada; nonsiklik sütçü ineklerde siklik aktivitenin başlatılması amacıyla en etkili tedavi protokolünün belirlenmesi ve bu tedavi protokollerinin folliküler gelişim üzerindeki etkileri araştırıldı.

Bizim çalışmamızda doğum sonrası 44. günden itibaren östrus göstermemiş ineklerin; -11, -2 ve 0. günlerde ovaryumların USG muayenelerinde CL belirlenememesi ve bu günlerde progesteron konsantrasyonlarının düşük olması (< 1 ng/mL) kriterlerine göre nonsiklik inek oranı % 22.5 (23/102) olarak belirlendi. Yapılan araştırmalar (Moreira ve ark. 2001, Lucy ve ark. 2001, Calder ve ark. 1999, Pursley ve ark. 2001); sütçü sığırlarda 7-12 günlük zaman aralıklarında düşük serum progesteron değerlerine dayanarak anovulasyon oranının % 18-38 arasında değiştiğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca Gümen ve ark. (2003); sütçü sığırlarda doğum sonrası 47-53. günlerden itibaren 7 gün ara ile yapılan iki USG muayenelerde ovaryumlarda CL tespit edilmeyen ve serum progesteron konsantrasyonları düşük olan anovular sığır oranını % 20.2 (64/316) olarak bulmuşlardır. Lopez ve ark. (2005) ise, USG ve serum progesteron değerlerine göre anovular inek oranının % 28.5 olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda, Türkiye koşullarında tespit ettiğimiz nonsiklik inek oranı son yapılan çalışma sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.

Tedavi başlangıcında grup I ve II arasında ovaryumlar üzerindeki en büyük follikül büyüklüklerinde istatistiksel farklılık saptandı. Xu ve ark. (2000b) nonsiklik sütçü ineklerde yaptıkları bir çalışmada, 10 mcg GnRH ve CIDR kullanmışlar, CIDR' ler uzaklaştırıldıktan 7 gün sonra 25 mg PGF_{2α} yapmışlar ve son olarak da 10. saatte 1 mg östradiol benzoat uygulamışlardır. Bu çalışmada tedavi başlangıcında ortalama en büyük çapları $14,3 \pm 1,1$ mm olan folliküllerin büyüklüklerine göre gruplar arasında dengeli bir şekilde dağılımlarının yapıldığı gözlemlendi. Bizim çalışmamızda, tedavi başlangıcında gruplardaki en büyük çaplı folliküller; Grup I' de $9,1 \pm 0,9$, Grup II' de $12,0 \pm 0,7$ ve Grup III' de ise $11,0 \pm 0,9$ mm olarak dağılımları rastgele yapıldı. Bu dağılıma göre; tedavi başlangıç günü olan 0. günde, tedavi gruplarında maksimum büyüklükleri 10 mm' den küçük follikülü bulunan inek sayıları; grup I' de 4 adet, Grup II' de 1 adet ve Grup III' de ise 1 adet olduğu tespit edildi. Bu farklılıkların, nonsiklik ineklerin gruplar arasında rastgele dağılımında, follikül

büyüklüklerine göre sınıflandırılarak dengelenmemesinden kaynaklanabileceği düşünüldü. Xu ve ark. (2000b)' nin yapmış oldukları çalışmada; GnRH' a cevap olarak iki gün içerisinde 7/8 inekte ovulasyonlar gözlenmesine karşılık, diğer inekte ise GnRH sonrası luteinizasyon saptanmıştır. Bizim çalışmamızda GnRH tedavisine cevap olarak; Grup II' de yer alan ineklerin tümünde (6/6) ovulasyonların tespit edilmesine karşılık, Grup III' te yer alan ineklerin 5/7' sinde ovulasyonlar gözlemlendi. Üçüncü grupta ovulasyon gözlenmeyen inekler bireysel olarak değerlendirildiğinde, ineklerin birisinde tedavi başlangıcında ovaryumlar üzerindeki en büyük follikül çapının 7 mm olduğu belirlendi. Xu ve ark. (1995); ortalama 6.7 mm çaplı folliküllerde LH reseptörlerinin mRNA ekspresyonunu tespit edememelerine karşılık 10.8 mm çaplı folliküllerde en üst düzeyde tespit ettiklerini ve deviasyon döneminde teka hücrelerinde LH reseptör mRNA ekspresyonunda dört kat bir artış şekillendiğini bildirmişlerdir. Jolly ve ark. (1994), farklı büyüklüklerdeki folliküllerin granuloza hücrelerindeki LH' a karşı in-vitro cAMP cevaplarını ölçerek folliküllerin 9 mm çaptan 10 mm'ye büyürken LH cevabında belirgin bir artışın şekillendiğini ortaya koymuşlardır. Sartori ve ark. (2001); deviasyondan hemen sonra (10 mm çaplı) folliküllerin yüksek dozda LH uygulamalarına (40 mg) ovulasyonla cevap vermelerine karşılık, deviasyon öncesinde 7-8.5 mm çaplı folliküllerin aynı dozda LH uygulamalarına ovulasyon cevabını vermediğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak, bu inekte ovulasyon gözlenmemesi nedeni, GnRH tedavi esnasında mevcut olan 7 mm çaplı folliküde LH reseptörlerinin bulunmamasına dayandırıldı. Üçüncü grupta yer alan diğer inekte ise, 0. günde en büyük follikül çapı 11 mm olmasına karşılık uygulanan GnRH sonrasında ovulasyon gözlenmedi. Martinez ve ark. (2002); dominant follikülün geç büyüme ve erken statik dönemlerinde GnRH enjeksiyonlarının genellikle ovulasyonlara neden olduğunu, buna karşılık dominant follikülün regresyon döneminde uygulanan GnRH enjeksiyonlarının ise ovulasyonları uyarılmayacağını bildirmişlerdir. Bu inekte GnRH tedavisi sırasında dominant follikülün regresyon döneminde olması ve bu esnada yeni ortaya çıkmış bir follikül dalgasının bulunması nedeniyle ovulasyon gözlenemeyeceği düşünüldü. Gruplarda uygulanan farklı tedavilere bağlı olarak deviasyon günlerinde istatistiksel farklılıklar ortaya çıkmıştır. Bu durum, tedavi başlangıcında Grup I' de yer alan ineklere uygulanan PRID' e tutturulmuş kapsül içerisindeki 10 mg östradiol benzoat ve II ile III. Gruplara uygulanan GnRH' nin folliküler dalga üzerinde farklı etkilere sahip olmasından kaynaklanabileceği düşünüldü. Diskin ve ark. (2002); progesteron salınan vaginal alet ile beraber farklı plazma östradiol konsantrasyonları sağlayan

östradiol benzoat [10 mg östradiol benzoat (kapsül), 0,75 mg östradiol benzoat (im) ve 5 mg östradiol benzoat (im)] uygulamalarının, tedavi başlangıcında mevcut folliküler dalgaların atrezisine neden olarak, 3-6 gün sonra yeni bir follikül dalgasının ortaya çıkmasına yol açtığını bildirmişlerdir. Bo ve ark. (1995), progesterin tedavisi ile beraber 5 mg östradiol-17 β uygulamaları antral folliküllerin regresyonuna yol açarak ortalama olarak 4,3 gün sonra yeni bir folliküler dalganın ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Oysa aynı dozda östradiol benzoat uygulamalarının 5.4 gün sonra yeni bir folliküler dalga emergence' i ile sonuçlanmıştır. Ryan ve ark. (1998), sütçü sığırlarda 250 mcg sentetik bir GnRH analogunun; gonadotropin salınımı, mevcut folliküler dalganın atrezisi ve yeni bir dalga oluşuncaya kadar geçen zaman aralığı üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada GnRH; postpartum günlere, progesteron konsantrasyonlarına (1 ng/mL'nin altında veya üstünde) ve folliküler dalganın aşamasına bağımlı olmaksızın LH ve FSH salınımlarına neden olduğu gözlenmiştir. Dominant follikülün seleksiyonu sonrası uygulanan GnRH, ovulasyona neden olarak (20/20), 1,6 \pm 0,3 gün sonra yeni bir folliküler dalganın ortaya çıkmasına yol açmıştır. Seleksiyon öncesi GnRH uygulamalarının mevcut follikül dalgasının ilerleyişinde herhangi bir etkisi olmamış ve 3,6 \pm 0,05 gün sonra dominant follikül ortaya çıkmıştır.

Tedavinin 7. gününde Grup I ve II arasında ovaryumlar üzerinde bulunan en büyük folliküller arasında farklılık saptandı. Bu durumun; tedavi başlangıcında uygulanan GnRH (II ve III. Grup) ve PRID üzerindeki östradiol kapsülü (Grup I) sonrasında Grup I ile II ve III. gruplar arasında deviasyon günlerindeki farklılıktan doğduğu düşünülmektedir. Bununla beraber, tedavinin 7. günde I ile III. Gruplar arasında istatistiksel farklılığın gözlenmeme sebebi; III. Grupta yer alan bir ineğin maksimum follikül büyüklüğünün 8 mm olması ve bu tedavi grubunun 7. gündeki genel ortalamasını düşürmesi gösterilebilir.

Bu çalışmada II ve III. Gruplarda saptanan ovulasyon folliküllerinin ortalama maksimum büyüklükleri 14,3 \pm 1,4 mm olmasına karşılık, Xu ve ark. (2000b) ovulasyon follikül büyüklüklerini 19.3 mm olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca, PRID' lerin vaginadan uzaklaştırılması ile ovulasyon arasında geçen ortalama zaman aralığı yönünden Xu ve ark. (2000b) tarafından elde edilen sonuçlarla (2,7 \pm 0,3) karşılaştırıldığında, bizim araştırmamızda (3.5 \pm 0.3) bu sürenin daha uzun olduğu tespit edildi. Xu ve ark. (2000b) ile bizim çalışmamızda uygulanan tedavi protokollerindeki büyük benzerliğe karşılık, tedavilere karşı alınan folliküler cevaplarda ve ovulasyon zamanlarında farklılıklar gözlemlendi. Bu durumun kullanılan hayvan materyalindeki bakım-

besleme, süt verimi, genetik ve çalışma ortamı varyasyonlarından kaynaklanabileceği düşünüldü. Bunun yanında çalışmalarda kullanılan vagina içi progesteron salan aletlerin içerdikleri progesteron hormonları miktarlarındaki farklılıkların (PRID= 1.55 gr; CIDR= 1.9 gr) da bu varyasyonlarda etkili olabileceği düşünüldü.

Xu ve ark. (2000b), nonsiklik sütçü ineklerde 7 gün süreli CIDR (1.9 gr progesteron) tedavisinde, ilk 24 saat içerisinde kan progesteron konsantrasyonu 2.5 ng/mL' ye kadar yükseldikten sonra tedrici (1ng/mL' nin altına inmemek üzere) olarak düştüğünü ve CIDR' nin vaginadan uzaklaştırılmasını takiben 24. saatte bazal seviyesinde kaldığını belirtmişlerdir. Gümen ve Wiltbank (91); anovular sığırlarda CIDR tedavisini takiben 3. saatte kan progesteron seviyelerinin 1.5 ng/mL' ye kadar yükseldikten sonra zaman içerisinde azalan bir seyir izlediklerini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da PRID sonrası benzer serum progesteron konsantrasyon seyri tespit edilmiştir.

PRID' lerin vaginadan uzaklaştırılmaları sonrasında II ve III. Gruplardaki progesteron profillerinde farklılıklar ortaya çıkmıştır. Üçüncü grupta PRID' lerin uzaklaştırılmalarını izleyen 10. saatte östradiol benzoat uygulaması ile preovulasyon LH salınımlarının daha erken uyarılması sonucu ovulasyonların öne alındığı (ovulasyon günleri; Grup II' de 11.8 \pm 0.6 ve Grup III' de 10.5 \pm 0.3 gün) tespit edildi.

Çalışmamızın tedavi gruplarındaki denek sayıları östrus ve gebelik oranlarını istatistiksel olarak değerlendirme için yeterli olmamasına karşılık; Grup II' de östrus tespit oranı % 50 (2/4) ve gebelik oranı % 33 (2/6), Grup III' de ise östrus tespit oranı % 83 (5/6) ve gebelik oranı % 42 (3/7) olarak bulundu. Xu ve ark. (2000b) çalışmalarının CGPE (CIDR-GnRH-PGF_{2 α} -Östradiol benzoat tedavisi) grubunda (3. tedavi grubunun benzeri), östrus tespit oranını % 100 (7/7) ve gebelik oranını % 50 (4/7) olarak bildirmişlerdir. CIDR' lerin uzaklaştırılmalarını takiben 1 mg östradiol benzoat uygulanması; diğer östrus senkronizasyon programları ile karşılaştırıldığında östrus tespit oranının artmasına tam bir östrus senkronizasyonuna ve gebelik oranlarında düşüşün şekillenmemesine neden olmuştur. Ayrıca, Ryan ve ark. (1998) benzer östrus senkronizasyon programının uygulandığı sıklık ve anöstruslu sığırlarda benzer östrus tespit ve gebelik oranlarını elde etmişlerdir. Üçüncü tedavi grubunda östrus tespit oranının 2. tedavi grubundan daha yüksek gözlenmesi, PRID sonrası östradiol benzoat uygulamasına bağlandı.

Birinci grupta 12 gün süreli uygulanan kapsüllü PRID tedavisinde nonsiklik ineklerin tümünde

(7/7) PRID sonrası persistent follikül oluşumu gözlemlendi. Zulu ve ark.(2003), çalışmalarında yer alan folliküler kistli hayvanların teşhisinde; ovaryumlar üzerinde 7-14 gün süre ile ≥ 25 mm çaplı folliküler yapıların bulunması, CL belirlenememesi ve serum progesteron konsantrasyonlarının $< 1\text{ng/mL}$ olması kriterlerini göz önünde bulundurmışlardır. Bu çalışmada; 17 folliküler kistli inek üzerinde 12 gün süre ile kapsüllü PRID tedavisi uygulanmış ve PRID tedavilerini takiben 14/17 (% 82) inekte 14 gün içerisinde CL' lar tespit edilmiştir. Aynı tedavi dizaynının uygulandığı ilk grubun sonuçları ile bu araştırmanın sonuçlarının örtüşmemesinin nedeni; bu grupta yer alan ineklerin follikül çaplarının 6,0-13,0 mm' lik dağılım aralığına sahip olmalarına karşılık, Zulu ve ark.(2003) çalışmalarında 25 mm'den büyük folliküllere sahip kistli inekleri kullanmışlardır. Bunun yanında anovulatör ineklere uygulanan tedavilere alınan cevaplardaki farklılıklar büyük ölçüde bakım-besleme ve yönetsel koşullara da bağlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Daha önce yapılan araştırmalarda Calder ve ark. (1999) ile Gümen ve Wiltbank (2005), nonsiklik ineklerin tek başına progesteron tedavisi sonrasında ovulasyonların gözlemlendiğini bildirmişlerdir.

Sonuç olarak; nonsiklik ineklerde Grup II ve III' de uygulanan tedavilerin östruslu ovulasyonların uyarılmasında ve siklik aktivitenin başlatılmasında etkili oldukları kanısına varıldı. Birinci gruba uygulanan 12 gün süreli kapsüllü PRID tedavisinin persistent follikül oluşumuna neden olması nedeniyle siklik aktivitenin başlatılmasında başarısız olduğu gözlenmiştir. Bu tedavi programında persistent follikül oluşum mekanizması ile ilgili daha fazla denek üzerinde ovaryumların günlük USG muayenelerinin yapılması ve dolaşımdaki FSH, LH, progesteron ve östradiol hormonlarının konsantrasyonlarının belirlenmesini kapsayan daha detaylı araştırmalar yapılarak ortaya koyulması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Ahmad N, Schrick FN, Butcher RI, Inskeep EK.** Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biol Reprod.* 1995; 52:1129.
- Alaçam E.** Sütçü sığırlarda dölverimi sorunları. *Hasad Dergisi.* 1992; 31-34.
- Bo GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ.** Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology.* 1995; 43: 31-40.
- Calder MD, Salfen BE, Bao Bao B, Youngquist RS, Garverich HA.** Administration of

progesterone to cows with ovarian follicular cysts results in a reduction in mean LH and LH pulse frequency and initiates ovulatory follicular growth. *J Anim Sci.* 1999; 77: 3037-3042.

- Cupp AS, Garcia-Winder M, Zamudio A, Mariscal V, Wehrman M, Kojima FN, Peters K, Bergfeld EG, Hernandez P, Sanchez T, Kittok R, Kinder J.** Two concentrations of progesterone (P4) in circulation have differential effect on pattern of ovarian follicular development in the cow. *Biol Reprod.* 1992; 44 (1): 64.
- Diskin MG, Austin EJ, Roche, JF.** Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domes Anim Endocrinol.* 2002; 23: 211-228.
- Fike KE, Day MI, Insked EK, Kinder JE, Lewis PE, Short RE, Hafs HD.** Estrus and luteal function in suckled beef cows that were anestrous when treated with an intravaginal device containing progesterone with or without a subsequent injection of estradiol benzoate. *J Anim Sci.* 1997; 75: 2009-2015.
- Ginther OJ, Kulick LJ, Kot K, Wiltbank MC.** Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology,* 48: 75-87, 1997.
- Gumen A, Guenther JN, Wiltbank MC.** Follicular size and response to ovsynch versus detection of estrus in anovular and ovular lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 2003; 86: 3184-3194.
- Gumen A, Wiltbank MC.** Length of progesterone exposure needed to resolve large follicle anovular condition in dairy cows. *Theriogenology.* 2005; 63: 202-218.
- Jolly PD, Tisdall DJ, Health DA, Lun S, McNatty KP.** Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cyclic adenosin 3', 5'-monophosphate response to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and follicular atresia. *Biol Reprod.* 1994; 51: 934-944.
- Lamming GE, Darwash AO.** The use of milk progesterone profiles to characterise components of subfertility in milked dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 1998; 52: 175-190.
- Littell RC, Henry PR, Ammerman CB.** Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J Dairy Sci.* 1998; 76: 1216-1231.
- Lopez H, Caraviello DZ, Satter LD, Fricke PM, Wiltbank MC.** Relationship between

- level of milk production and multiple ovulations in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 2005; 88: 2783-2793.
- Lucy MC, Savio JD, Badinga L, De La SOTA RL, Thatcher WW.** Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci.* 1992; 70: 3615-3626.
- Lucy MC, Thatcher WW, Macmillan KL.** Ultrasonic identification of follicular populations and return to estrus in early postpartum dairy cattle given intravaginal progesterone for 15 days. *Theriogenology.* 1990; 34: 325.
- Lucy MC, Billings HJ, Butler WR, Ehnis LR, Fields MJ, Kesler DJ, Kinder JE, Mattos RC, Short RE, Thatcher WW, Wettemann RP, Yelich JV, Hafs HD.** Efficacy of an intravaginal progesterone insert and an injection of PGF_{2α} for synchronizing estrus and shortening the interval to pregnancy in postpartum beef cows, peripubertal beef heifers and dairy heifers. *J Anim Sci.* 2001; 79: 982-995.
- Martinez MF, Kastelic JP, Adams GP, Cook B, Olson WO, Mapletoft RJ.** The use of progestins in regimen for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Theriogenology.* 2002; 57: 1049-1059.
- Mihm M, Baguisi A, Boland MP, Roche JF.** Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. *J Reprod Fertil.* 1994a; 102: 123.
- Mihm M, Curran N, Hyttel P, Boland MP, Roche JF.** Resumption of meiosis in cattle oocytes from preovulatory follicles with a short and a long duration of dominance. *J Reprod Fertil.* 1994b; 13: 36.
- Mongiardino ME, Dick AR, Murray R, Maciel M, Ramos G, Balbiani G.** Applied biotechnology for improving fertility of herds in Argentina, proceeding of the final research coordination meeting of the FAO/IAEA/ARCAL, 3. regional network for improving the reproductive management of meat and milk producing livestock in Latin America with the aid of radioimmunoassay organized by the joint FAO Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and Held in Bogota, 19-23 September 1988, International Atomic Energy Agency, Vienna, page: 101-117, 1990.
- Moreira F, Orlandi C, Risco CA, Mattos R, Lopes FL, Thatcher WW.** Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 2001; 84: 1646-1659.
- Mwaanga ES, Janowski T.** Anoestrus in dairy cows: causes, prevalence and clinical forms. *Reprod Domes Anim.* 2000; 35: 193-200.
- Peter AR, Lamming GE.** Lactational anoestrus in farm animals. in 'Oxford Reviews of Reproductive Biology', Ed. MILLIGAN S.R., Vol. 12, University Press, Oxford, 1990; 245-288.
- Pursley JR, Fricke PM, Garverich HA, Kesler DJ, Ottobre JS, Stevenson JS, Wiltbank MC.** Improved fertility in noncycling lactating dairy cows treated with exogenous progesterone during Ovsynch. *J Dairy Sci.* 2001; 83 (1): 1563.
- Rajamahendran R, Taylor C.** Follicular dynamics and temporal relationships among body temperature, oestrus, the surge of luteinizing hormone and ovulation in Holstein heifers treated with norgestomet. *J Reprod Fertil.* 1991; 92: 461.
- Rhodes FM, McDougall S, Burke CR, Verkerk GA, Macmillan KL.** Treatment of cows with an extended postpartum anoestrus interval. *J Dairy Sci.* 2003; 86: 1876-1894.
- Roche JF, Mihm M, Diskin MG, Ireland JJ.** A review of regulation of follicle growth in cattle. *J Anim Sci.* 1988; 76: 16-29.
- Roche JF, Mackey D, Diskin MD.** Reproductive management of postpartum cows. *Anim Reprod Sci.* 2000; 60-61: 703-712.
- Ryan M, Mihm M, Roche JF.** Effect of GnRH given before or after dominance on gonadotrophin response and the fate of that follicle wave in postpartum dairy cows. *J Reprod Fertil.* 1998; 21: 61.
- Ryan DP, Galvin JA, O'Farrell KJ.** Comparison of estrus synchronization regimens for lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 1999; 56: 153-168.
- Sanchez T, Wehrman ME, Kojima FN, Cupp AS, Bergfeld EG, Peters KE, Mariscal V, Kittok RJ, Kinder JE.** Dosage synthetic progestin, norgestomet influences luteinizing hormone pulse frequency and endogenous secretion of 17β-oestradiol in heifers. *Biol Reprod.* 1995; 52: 464.
- Sartori R, Fricke PM, Ferreira JCP, Ginther OJ, Wiltbank MC.** Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol Reprod.* 2001; 65: 951-957.

- Savio JD, Thatcher WW, Badinga L, De La Sota RL, Wolfenson D.** Regulation of dominant follicle turnover during the oestrus cycle in cows. *J Reprod Fertil.* 1993; 97: 197-203.
- Sirois J, Fortune JE.** Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology.* 1990; 127: 916-925.
- Stevenson JS, Tompson KE, Forbes WL, Lamb GC, Grieger DM, Corah LR.** Synchronizing estrus and (or) ovulation in beef cows after combinations of GnRH, norgestomet and prostaglandin F2 α with or without timed insemination. *J Anim Sci.* 2000; 78: 1747-1758.
- Stock AE, Fortune JE.** Ovarian follicular dominance in cattle: Relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology.* 1993; 132: 1108-1114.
- Taylor C, Rajamahendran, Walton JS.** Ovarian follicular dynamics and plasma luteinizing hormone concentrations in norgestomet-treated heifers. *Anim Reprod Sci.* 1993; 32: 173.
- Xu ZZ, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS.** Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol Reprod.* 1995; 53: 951-957.
- Xu ZZ, Burton LJ, McDougall S, Jolly PD.** Treatment of noncyclic lactating dairy cows with progesterone and estradiol or with progesterone, GnRH, prostaglandin F2 α and estradiol. *J Dairy Sci.* 2000a; 83: 464-470.
- Xu ZZ, Verkerk GA, Mee JF, Morgan SR, Clark BA, Burke CR, Burton LJ.** Progesterone and follicular changes in postpartum noncyclic dairy cows after treatment with progesterone and estradiol or with progesterone, GnRH, PGF2 α , and estradiol. *Theriogenology.* 2000b; 54: 273-282.
- Yavas Y, Walton JS.** Postpartum acyclicity in suckled beef cows. *Theriogenology.* 2000; 54: 25-55.
- Zulu VC, Nakao T, Yamada K, Moriyoshi M, Nakada K, Sawamukai Y.** Clinical response of ovarian cysts in dairy cows after PRID treatment. *J Vet Med Sci.* 2003; 65(1): 57-62.

Molecular Characterization of *Demodex Canis* (Acarina: Demodicidae) in Domestic Dogs (*Canis Familiaris*)[#]

Gökmen Zafer PEKMEZCİ*, Didem PEKMEZCİ², Cenk Soner BOLUKBAS³

¹Department of Preclinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Ondokuz Mayıs University, Samsun 55139, Turkey

²Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Ondokuz Mayıs University, Samsun 55139, Turkey

³Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Ondokuz Mayıs University, Samsun 55139, Turkey

[#]This study was presented in 1st International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2018) 26-27 April 2018, Ankara/Turkey

*Corresponding author e-mail: zpekmezci@omu.edu.tr

ABSTRACT

Canine demodicosis (CD) is an inflammatory skin disease caused by excessive proliferation of *Demodex* mites (Acarina: Demodicidae) former in the dogs' follicles latter in the sebaceous glands. To date *Demodex canis*, *D. injai*, and *D. cornei* are the three *Demodex* species that recognized in the domestic dog *Canis familiaris*. There are reports of morphological identification of *Demodex* spp. from pet dogs in Turkey. Nevertheless there had been no reports of characterizing the *Demodex* mite from pet dogs in Turkey using well-defined mitochondrial DNA gene sequences. The aim of the present study is to reveal first molecular characterization data on *D. canis* infesting domestic dogs (*Canis familiaris*) in Turkey. *Demodex* mites were obtained from skin scrapings of dogs with CD and identified microscopically as *D. canis*. The mitochondrial DNA 12S (mtDNA 12S) rRNA gene amplified, sequenced and compared with available *Demodex* sequences in Genbank using BLAST analyses. *D. canis* isolate (DP-Samsun, MH374631) obtained in the study matched 100% (474/474) with previously reported gene sequences for the 12S rRNA of mtDNA in *D. canis* (KX264486, isolate Demo.can2) from dogs in China. Pairwise comparison between the 12S rRNA sequences of the *D. canis* from Turkey (MH374631) and other mtDNA rRNA gene of *D. canis* isolates from China (KX264486-88) presented differences ranging from 0.0 to 0.6 %. In conclusion, within the present study, we provided the molecular characterization of *D. canis* in domestic dogs for the first time by sequencing of the partial mtDNA in Turkey.

Keywords: *Demodex canis*, Dog, Molecular characterization, PCR, Sequencing.

Evcil Köpeklerde (*Canis Familiaris*) *Demodex Canis*'in (Acarina: Demodicidae) Moleküler Karakterizasyonu

ÖZ

Kanin demodikozis (KD) *Demodex* akarlarının (Acarina: Demodicidae) kıl köklerinde ve yağ bezlerinde aşırı çoğalmasının neden olduğu inflamatuvar bir deri hastalığıdır. Bugüne kadar evcil köpeklerde *Canis familiaris* bildirilen üç *Demodex* türü *D. canis*, *D. injai* ve *D. cornei*'dir. Türkiye'de pet köpeklerinde *Demodex* spp.'nin morfolojik identifikasyonu ile ilgili raporlar vardır. Buna rağmen Türkiye'de evcil köpeklerde *Demodex* akarlarının iyi tanımlanmış mitokondriyal DNA gen sekanslarının moleküler karakterizasyonu ile ilgili raporlar yoktur. Bu çalışmanın amacı Türkiye'de evcil köpeklerde (*Canis familiaris*) *D. canis* üzerine ilk moleküler karakterizasyon verilerini ortaya çıkarmaktır. *Demodex* akarları KD'li köpeklerin deri kazıntularından elde edildi ve mikroskopik incelemeler ile *D. canis* olarak teşhis edildi. Mitokondriyal DNA'nın 12S rRNA geni çoğaltıldı, sekanslandı ve Genbank'ta BLAST analizleriyle mevcut bilinen *Demodex* sekansları ile karşılaştırıldı. Araştırmada elde edilen *D. canis* izolatu (DP-Samsun, MH374631) Çin'de daha önce köpeklerde rapor edilen *D. canis* 12S rRNA gen sekansı (KX264486, Demo.can2) ile % 100 (474/474) olarak eşleşti. Türkiye'den *D. canis*'in 12S rRNA dizisi (MH374631) ile Çin'den rapor edilmiş *D. canis* izolatlarının (KX264486-88) 12S rRNA sekansları arasındaki ikili hizalama analizleri % 0,0 ile % 0,6 arasında değişen farklılıkları ortaya çıkarmıştır. Sonuç olarak bu araştırma ile Türkiye'de ilk kez evcil köpeklerde *D. canis* türünün moleküler karakterizasyonu mitokondriyal DNA sekansları kullanılarak sağlandı.

Anahtar Kelimeler: *Demodex canis*, DNA dizileme, köpek, moleküler karakterizasyon, PZR.

To cite this article: Pekmezci G.Z. Pekmezci D. Bolukbas C.S. Molecular Characterization of *Demodex Canis* (Acarina: Demodicidae) in Domestic Dogs (*Canis Familiaris*). Kocatepe Vet J. (2018) 11(4): 430-433.

INTRODUCTION

Canine demodicosis (CD) is an inflammatory skin disease caused by excessive proliferation of *Demodex* mites (Acarina: Demodicidae) in the hair follicles and sebaceous glands. There are three recognized canine *Demodex* mites and these species are *D. canis*, *D. injai*, and *D. cornei* in domestic dog *Canis lupus familiaris* (L.). *Demodex canis* is the main causative agent of CD (Scott et al. 2001, Izdebska and Rolbiecki 2018).

Despite CD is a well-known challenging problem in veterinary medicine, little is known about the phylogenetic relationships of this demodecid (Silbermayr et al. 2015). Mitochondrial genes have been successfully applied in order to carry out phylogenetic and taxonomic works in various taxa of mites (Simon et al. 1994). The rapid advances in molecular techniques support a useful technical achievement for the molecular characterization of *Demodex* at a genetic level (Hu et al. 2017). The mitochondrial (mtDNA) 16S has been used for molecular characterization of the Demodecid mite (Frank et al. 2013, Zhao et al. 2013, Silbermayr et al. 2015, Sastre et al. 2016) and mt-cox1 (De et al. 2012, Zhao et al. 2014). Moreover, mitochondrial 12S was recently found more applicable than other DNA barcoding gene (cox1 and 16S) for molecular characterization of Demodecid mites at genus or species level (Hu et al. 2017).

In Turkey, there are reports of morphological identification of *Demodex* spp. from pet dogs (Deger et al. 1994, Beyazit et al. 2010, Maden et al. 2012, Pekmezci et al. 2014). To date there had been no reports of characterizing the *Demodex* mite from pet dogs in Turkey using well-defined mtDNA gene sequences.

The aim of the present study is to describe first molecular characterization of *D. canis* in domestic dogs (*Canis familiaris*) in Turkey.

MATERIAL and METHODS

Parasitological examinations, DNA extraction and PCR Analysis

Demodex mites were obtained from skin scrapings of dogs which brought to the Veterinary Teaching and Animal Hospital, of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Ondokuz Mayıs, in April 2017 to December 2017 diagnosed as CD in Turkey. *Demodex* mites were primarily identified microscopically and classified as *D. canis*. The parasites were collected by using a micropipette and added to 50 µl of ethanol. Genomic DNA (gDNA) was extracted from pooled mites using a

commercial kit (GeneJet, Thermo Scientific). The mitochondrial 12S rRNA gene was selected to molecular identification of *Demodex* species. The mtDNA 12S was amplified using 12S-F (CTACITTTGTTACGACTTATTTTA) and 12S-R (GCCAGCAGTTTCGGTTA) (Hu et al. 2017). The PCR conditions followed the protocol described by Cheng et al (2015). PCR amplicons were visualized on 1% agarose gel by UV transillumination.

DNA sequencing and molecular analysis

DNA sequencing was performed by MacroGen Inc. (Amsterdam, NL) for mtDNA 12S gene. Sequences quality was checked using Geneious R11 (Biomatters Ltd) (Kearse et al. 2012). Later, obtained sequences were confirmed by both comparisons, assembled and edited with using Geneious R11 (Biomatters Ltd) (Kearse et al. 2012). The consensus sequences were compared with those previously published data for molecular identification by using the BLAST within the GenBank database (Altschul et al. 1990) and aligned with those previously characterized sequences of *D. canis* using ClustalW in Mega 7.0 multiple sequence alignments (Thompson et al. 1994). Nucleotide composition was calculated using Bioedit (Hall 1999). Genetic distances were calculated using the Kimura two-parameter model with pairwise deletion in Mega 7.0 (Kumar et al. 2016). Molecular analyses were carried out comparatively according to sequences obtained in previous studies in Genbank (Hu et al. 2017).

RESULTS

In the present study, *Demodex canis* was microscopically identified from dogs (Figure 1). The amplification of the mtDNA 12S RNA gene produced a fragment of approximately 500 bp. The mtDNA PCR product was subjected to direct sequencing giving products 474 bp long. The average percentage of nucleotide composition for the partial fragment was: 30.17 % (A), 6.12 % (C), 17.09 % (G), and 46.62 % (T). The G+C content were 23.21%. The consensus nucleotide sequence was submitted in the GenBank database under the accession number MH374631. *Demodex canis* (isolate DP-Samsun, MH374631) from Turkey matched 100% (474/474) previously reported gene sequences for the mtDNA 12S rRNA in *D. canis* (KX264486, isolate Demo.can2) from dogs in China (Hu et al. 2017). Moreover, *D. canis* isolate DP-Samsun from Turkey (MH374631) showed 99.2 to 99.8% identities with *D. canis* (isolate Demo.can3, KX264487 and Demo.can4, KX264488) from China according to 12S region (Hu et al. 2017). We herein report that our sequence (MH374631) differed by three

polymorphic sites (alignment positions 28, 33 and 257) with the sequences of *D. canis* isolate Demo.can3 (KX264487) and one nucleotide (alignment position 210) in the mtDNA 12S rRNA sequence of *D. canis* isolate Demo.can4 (KX264488) from the China (Hu et al. 2007). Pairwise comparison between the mtDNA 12S rRNA sequences of the *D. canis* from Turkey (MH374631) and other *D. canis* isolates from China (KX264486-88) presented differences ranging from 0.0 to 0.6 %.



Figure 1: Microscopic image of *Demodex canis* mite (original).

DISCUSSION

For a long while classification of *Demodex* mites has relied on hosts and morphological characteristics. Interestingly, the morphological characteristics of *Demodex* mites are prone to the influence of environment which may lead to different classifications of phenotypes. Additionally, different *Demodex* species might coexist in the host and cause difficulty in species differentiation (Zhao et al. 2013). Successfully, in the last decade DNA barcoding techniques support a useful achievement for the molecular characterization of *Demodex* species in animals (Zhao et al. 2014). The mitochondrial genes have a maternal inheritance, rapid evolution and various evolution rates for different regions have been most entirely provided in molecular characterization among the arthropod species (De et al. 2012, Frank et al. 2013, Zhao et al. 2013, 2014, Silbermayr et al. 2015; Sastre et al.

2016). Recently, the mtDNA 12S is proved to be used more suitable than the other DNA barcoding gene for molecular characterization of Demodicid mites (Hu et al. 2017). Therefore, molecular identification and characterization of *D. canis* has also proved by molecular evidence inferred from a mitochondrial 12S marker used in the current study. In Turkey, *Demodex* species was only morphologically reported from different companion animals (Deger et al. 1994, Beyazit et al. 2010, Maden et al. 2012, Pekmezci et al. 2014). However, to date, there is no molecular identification of *Demodex* species in Turkey. Furthermore, within the present study, we also provide the first molecular evidence of *D. canis* in domestic dogs.

In conclusion, present study confirms that mitochondrial 12S partial sequence is a useful tool to discriminate *D. canis* isolate from domestic dog in Turkey as previously reported by Hu et al (2017). Therefore, mitochondrial 12S-based identification in Demodicidae should also be used in the other domestic and livestock animals in Turkey.

REFERENCES

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990; 215: 403-410.
- Beyazit A, İnceboz T, Över L.** Tek tıp, tek sağlık konseptine katkı: Demodicosisli bir köpek. *Türkiye Parazitol. Derg.* 2010; 34(1), 68-71.
- Cheng J, Liu CC, Zhao YE, Hu L, Yang YJ, Yang F, Shi ZY.** Population identification and divergence threshold in Psoroptidae based on ribosomal ITS2 and mitochondrial *cox1* genes. *Parasitol. Res.* 2015; 114: 3497-3507.
- De RM, Riazzo C, Callejón R, Guevara D, Cutillas C.** Morphobiometrical and molecular study of two populations of *Demodex folliculorum* from humans. *Parasitol. Res.* 2012; 110: 227-233.
- Deger S, Tascı S, Akgül Y, Alkan İ.** Van ve yöresinde evcil hayvanlarda ektoparazitler dermatitisler. *Y. Y. Üniv. Vet. Fak. Derg.* 1994; 5(1): 155-161.
- Frank LA, Kania SA, Chung K, Brahmabhatt R.** A molecular technique for the detection and differentiation of *Demodex*, mites on cats. *Vet. Dermatol.* 2013; 24: 82-83.
- Hall TA.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 1999; 41: 95-98.

- Hu L, Yang Y, Zhao Y, Niu D, Yang R, Wang R, Li X.** DNA barcoding for molecular identification of *Demodex* based on mitochondrial genes. *Parasitol. Res.* 2017; 116(12): 3285-3290.
- Izdebska JN, Rolbiecki L.** The status of *Demodex cornei*: description of the species and developmental stages, and data on demodicid mites in the domestic dog *Canis lupus familiaris*. *Medical and Vet. Entomol.* 2018; <https://doi.org/10.1111/mve.12304>.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Mentjies P, Drummond A.** Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 2012; 28(12): 1647-1649.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K.** MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33: 1870-1874.
- Maden M, Er C, Kav, K, Özdemir Ö.** İngiliz pointer ırkı bir köpekte *Demodex canis* kökenli atipik dermatitis olgusunun başarılı sağaltımı. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.* 2012; 18(6): 1073-1077.
- Pekmezci D, Pekmezci GZ, Guzel M, Cenesiz S, Gurler AT, Gokalp G.** Efficacy of amitraz plus inactivated *parapoxvirus ovis* in the treatment of canine generalised demodicosis. *Vet. Rec.* 2014; 174(22): 556-556.
- Sastre N, Francino O, Curti JN, Armenta TC, Fraser DL, Kelly RM, Hunt E, Silbermayr K, Zewe C, Saánchez A, Ferrer L.** Detection, prevalence and phylogenetic relationships of *Demodex* spp and further skin prostigmata mites (Acari, Arachnida) in wild and domestic mammals. *PLoS One* 2016; 11:e0165765.
- Scott DW, Miller WM, Griffin CE (2001)** Parasitic Skin Diseases, In: Muller and Kirk's Small Animal Dermatology, Ed; Di Berardino C, 6th Ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA. pp. 423–516.
- Silbermayr K, Horvath-Ungerboeck C, Eigner B, Joachim A, Ferrer L.** Phylogenetic relationships and new genetic tools for the detection and discrimination of the three feline *Demodex* mites. *Parasitol. Res.* 2015; 114(2): 747-752.
- Simon C, Frati F, Beckenbach AT, Crespi B, Liu H, Flook P.** Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Entomol. Soc. Am.* 1994; 87: 651-701.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22: 4673-4680.
- Zhao YE, Cheng J, Hu L, Ma JX.** Molecular identification and phylogenetic study of *Demodex caprae*. *Parasitol. Res.* 2014; 113: 3601-3608.
- Zhao YE, Hu L, Ma JX.** Molecular identification of four phenotypes of human *Demodex* mites (Acari: Demodicidae) based on mitochondrial 16S rDNA. *Parasitol. Res.* 2013; 112(11): 3703-3711.

The Use of L-Carnitine and Oregano As Feed Additives in Alternative Forced Molting Programmes in Laying Hens[#]

A.Burhaneddin AKKAYA¹, İsmail BAYRAM^{2*}

¹Dr. Vet. Hek., CB-Ideal Şt. Afyonkarahisar-TURKEY

²Dep. of Animal Nutrition, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, Afyonkarahisar-TURKEY

[#]This article was summarised from PhD thesis. Thesis No: 2011-009 AKÜ Health Sciences Institute.

*Corresponding author e-mail: ibayram1965@gmail.com

ABSTRACT

This research was carried out in order to determine the effects of forced molting programs induced by feeding the hens an alfalfa based and low Na-Ca induction feed as an alternative to forced molting program with feed withdrawal and the effect of L-carnitine and Oregano plant in powder form as feed additives on the induction period parameters. A total of 1170 birds were divided into 13 groups. The trial was continued for a total of 36 days, with the first 14 days of adaptation and 22 days of force molting. A negative control group (K) which was neither forced molted nor provided with any feed additive substances in their diets. Moreover, other three treatment groups (M: Marbel powder, Y: Alfalfa, F: Low Ca-Na diet), were forced molted and one withhold feeding group was used for the study; the forced molted groups were supplied L-carnitine (C) (100 ppm) and dried oregano leaves (O) (5%) as a feed additive in designed individual diets (MC, AC, FC, MO, AO, FO) alone and in combination (50 ppm; 2.5%) in groups (MCO, ACO, FCO). In the light of this data it could be said that the live weight loss achieved with qualitative alfalfa meal feed restriction exceeds 30% and exceeds the live weight loss ensured by an 11 day feed withdrawal. Based on these parameters it is concluded that supplementing feed additives into alfalfa meal could be an alternative to the feed withdrawal method and alfalfa meal with a combination of L-carnitine and oregano plant has a positive impact on performance.

Keywords: Moulting, Laying Hen, L-Carnitine, Oregano, Egg Yield

Yumurtacı Tavuklarda Kekik (Oregano) ve L-karnitin'in Yem Katkısı Olarak Alternatif Zorlamalı Tüy Dökümü Programında Kullanılması

ÖZ

Bu araştırma, yem çekmeli zorlamalı tüy dökümü programına alternatif olabileceği düşünülen yonca unu esaslı ve düşük Na-Ca ihtiva eden zorlanım yemi kullanılarak yapılan zorlamalı tüy dökümü programlarının ve zorlanım periyodunda yem katkı maddesi olarak toz formda L-karnitin ve kekik bitkisinin, zorlanım dönemi parametreleri üzerine etkilerini belirlemek amacı ile gerçekleştirilmiştir. Deneme, zorlanım uygulanmayan ve yem katkı maddeleri kullanılmayan bir negatif kontrol grubu (K); biri yem çekmeli olmak üzere 3 adet zorlamalı tüy dökümü metodu uygulanan deneme grupları (M: Mermer tozu, A: Yonca, F: Düşük sodyum-kalsiyumlu yem), zorlanım uygulanan gruplara yem ilavesi olarak L-karnitin (C) (100 ppm) ve kurutulmuş kekik (O) (%5) tozunun belirlenen oranlarda ayrı ayrı (MC, AC, FC, MO, AO, FO) ve birlikte kullanıldığı (50 ppm; %2,5) gruplar (MCO, ACO, FCO) olmak üzere, her grupta 6 tekerrür ve tekerrür gruplarında 15 adet hayvan olacak şekilde 13 grupta toplam 1170 tavuk üzerinde yürütülmüştür. Deneme ilk 14 gün alıştırmaya, 22 gün zorlanım dönemi olacak şekilde toplam 36 gün boyunca sürdürülmüştür. Araştırmada, yonca unu ile yapılan kalitatif yem kısıtlaması ile canlı ağırlık kaybının %30'u geçtiği ve 11 gün açlığın sağladığı canlı ağırlık kaybından daha fazla canlı ağırlık kaybına neden olduğu tesbit edilmiştir. Sonuç olarak, yonca ununun, yem çekme metoduna alternatif olabileceği, bilhassa yonca ununa L-karnitin ve kekik bitkisinin bir arada katılmasının performans üzerine olumlu etkiler gösterdiği kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Zorlamalı Tüy dökümü, Yumurta Tavuğu, L-Karnitin, Kekik, Yumurta Verimi

To cite this article: Akkaya A.B. Bayram İ. The Use of L-Carnitine and Oregano As Feed Additives in Alternative Forced Molting Programmes in Laying Hens[#]. Kocatepe Vet J. (2018) 11(4): 434-446.

INTRODUCTION

The increasing concern in the world for sustainable animal welfare has generated a need to develop alternative methods for the traditional forced moulting methods which are effective and economical. Moulting is a physiological event in poultry which incurs naturally before the days get shorter and the migration season. The procedure involving rapid moulting and the regeneration of feathers and subsequent stimulation of egg-laying within a program is known as "Forced Moulting" (Turkoglu et al. 1997). Forced moulting is a method used to prolong the productive life of broiler and laying hens or to interrupt egg laying temporarily when egg prices are very low. Various methods are used for this purpose, such as restrict feeding, water and light, providing feed with inadequate calcium or sodium, adding elements such as aluminium, zinc and iodine, feeding only grain and administering various drugs and hormones (Senkoylu 2001, Berry 2003, Webster 2003, Kakhki et al. 2018). It has been reported that instead of the traditional limitation of feed and water for laying hens, the application of alternative forced moulting methods without subjecting the hens to restricted feeding can provide better living conditions for the animals and facilitate the transition from the resting period to the production period (Koelkebeck and Anderson 2007). Minoura et al. (2005) reported that egg production is enhanced by the implementation of forced moulting by feed prepared with wheat bran or fat free rice bran. McReynolds et al. (2006) reported that the colonization of *Salmonella enteritidis* is restricted in forced moulting when clover is used together with layer feed. In a study in which forced methods were used as an alternative to the traditional methods, it was noted that the administration of Vitamin E had a positive impact on the immune systems of layer hens (Gulhan et al, 2006). Increasing concerns for animal welfare emphasize the importance of other methods which provide better living conditions for poultry without keeping them on fasting. The alfalfa flour can be an alternative material for forced moulting like feed withdrawal method (Landers et al. 2005 ; Donalson et al. 2005; Kim et al.,2006; Landers et al. 2008). Kim et al. (2007) reported that the provision of alfalfa based rations during the moulting period produced effects which are similar to those generated by feed withdrawal and that the application of alfalfa flour may be beneficial to the sustenance of the mechanical properties of the bones. It has been reported that applications without feed withdrawal are less harmful in terms of bone mineral density and concentration compared to feed withdrawal (Mazzuco and Hester 2005). Szabo et al. (2005) reported that during a forced moulting applied for 12 days with classical

feed withdrawal caused severe hepatic membrane degradation and increased lipid peroxidation.

Carnitine (β -hydroxy γ -trimethylamine butyrate) is a vitamin-like substance that plays an important role in the anabolism and catabolism of lipids and is a cofactor involved in the passage of long chain fatty acids into the mitochondrial matrix (Zhai 2007). There are several studies which indicate that it increases egg production and their weight, decreases abdominal fat ratio and improves feed utilization in poultry (Ergün et al. 2004; Harmeyer 2002, Hrnar et al. 2015). It has also been used extensively in recent years as an alternative feed additive to support the immunity system (Rabie et al. 1997a). Studies have reported that the addition of L-Carnitine into balanced rations increases live body weight gain (Rabie et al. 1997a) and decreases abdominal fat ratio (Buyse et al. 2001; Xu et al. 2003) while other studies indicated that the addition of L-Carnitine has no impact on live weight, feed utilization (Buyse et al. 2001, Lien and Horng 2001) or abdominal fat percentage (Lien and Horng 2001).

Although there are numerous studies regarding the impact of Oregano leaves and its oil in particular in the strengthening of antibacterial, antioxidant properties, as an alternative growth factor, as an antiseptic, anticoccidial and immune system enhancer (Baratta et al.1998; Lambert et al. 2001; Si et al. 2008) but the number of studies dealing with the applicability of the oregano leaves powder and its products for forced moulting are limited.

Keeping in view the above facts, current study has been conducted to determine the impact of dried Oregano and L-Carnitine alone or in combination during the process of moulting when commercial laying hens fed alfalfa flour or a concentrated feed mix with low Na-Ca content as an alternative to the conventional method in terms of viability, stress, production parameters and metabolism.

MATERIAL and METHODS

1170 white laying hens of Lohmann LSL breed at the age of 72 weeks were used in this study and carried out in the poultry unit of Afyon Kocatepe University Livestock Research Center (KUHAM). The experimental protocols were approved by the Animal Care and Use Ethical Committee at Afyon Kocatepe University (147-2008). The concentrated feed mix used during the adaptation and egg laying periods and fed to the negative control group during the trial period in the study were formulated according to NRC (1994) (Table 1). The alfalfa and Oregano used in the study were the products of (İzmir Oregano; *Oreganum onites*) in powder form. L-Carnitine was used as a premix with 50.000 mg L-Carnitine HCL per one kilogram. The study

comprised of 13 groups, one was negative control group (K) and not subjected to forced moulting and received no additional additives; 3 treatment groups (Marbel:M, Alfalfa:A, Low Na-Ca: F) were subjected to forced moulting methods and one of which was subjected to feed withdrawal; the groups subjected to forced moulting were given L-carnitine (C) and dried oregano leaves powder (O) as a feed additive alone (MC, AC, FC, MO, AO, FO) and together (MCO, ACO, FCO,) with 6 replicates in each group and 15 animals in each replicate (Table 2). The birds were placed randomly into an apartment type cage system with 5 animals in each cage. During the forced moulting period the moulting groups were subjected to light restriction while the negative control group was kept under the same environmental conditions with no light restriction and ensured 16 hours of light in their cages within the unit. Water was provided *ad libitum* to all the groups during the trial. The first 2 weeks of the trial was used for adaptation and 22 days were used for the forced moulting period. The moulting groups were given 100 ppm of L-carnitine HCl and 5% dried oregano leaves powder separately and 50 ppm of L-carnitine HCl and 2.5% dried oregano leaves powder together. At the start of the study, all animals were immunized with an oil-adjuvanted inactivated vaccine against Newcastle Disease, Infectious Bronchitis and Egg Drop Syndrome Disease with a 0.5 cc intramuscular injection per animal. These vaccines were obtained from MSD-Intervet company.

Six animals from each subgroup were weighed on a digital scale at the start of the moulting period as well as 4 times during the trial and at the end of the period, in total 6 times to determine their live weights and the changes in live weight was calculated. Feed consumption was determined by weighing on the 11th and 22nd days of the moulting period. After the 11th day of the moulting period, the groups subjected to moulting with feed withdrawal, (M groups) were given 40 grams of barley per day, on the last day of the trial the remaining amount of barley in the group feeders were weighed to calculate barley consumption. Egg yield (including cracked, broken and abnormal eggs) was recorded daily during the moulting period. During the study, mortality was recorded on daily basis while moulting period viability and yield period viability were calculated as percentage. Blood samples were collected from 6 hens in each group on the 11th and 22nd days of the moulting period. Malondialdehyde (MDA), Glutathione (GSH) and antioxidant activity (AOA) were determined for the collected samples according to the methods described by Draper et al. (1986), Beutler et al (1986) and Koracevic et al (2001) respectively. The antibody titers of Newcastle

Disease were measured by Hemagglutination Inhibition (HI) test in the 2log, 8HA unit for the assessment of the impact of the humoral immunity induced by vaccination, moulting methods and the feed additives used and the results were recorded. At the end of the moulting period 6 animals from every group were euthanized by cervical dislocation and their weights were measured and recorded. The liver, spleen, full and empty stomach weights of the euthanized animals, digestive system were weighed with a digital scale and intestinal lengths were measured with the aid of a ruler. At the end of the moulting period, Ca and P analyzes were performed according to AOAC (1984) after removing the right tibia bones from the euthanized animals and removing the fat with ether extraction. The feed used in the trial was analyzed according to (AOAC 1984) (Table 2). Statistical analyzes of the collected data was performed using one-way analysis of variance in the J.M.PTM 5.0.1a (SAS Institute Inc., A Business Unit of SAS 1989-2002) package program. Tukey test was applied on the data to assess importance.

RESULTS

The amounts of consumed moulting feed by the trial groups (0-11. day;11-22. day) are indicated in Table 3. While all the groups had a homogenous distribution of live weight at the start of the trial, it is noted that the live weights of groups which were not subjected to moulting had not decreased at the end of the trial whereas live weight loss had incurred in the groups which were moulted (Table 4). Egg yield, cracked-broken eggs and abnormal egg percentage values throughout the moulting period (0-22. day) are shown in Table 5. When the serum ND titers measured with HI from the blood samples taken on day 11 and day 22 of the moulting period were assessed, it was noted that the antibody titers in the experimental groups were not different from the titers of the non-moulted hens ($P > 0,05$) (Table 6). The values for the organ weights and the live weights of the animals slaughtered at the end of the moulting period are shown in Table 7. When the results of MDA, GSH and AOA in the blood samples taken on the 11th and 22nd days of the moulting period were evaluated, it was discovered that there was no significant difference between the MDA and GSH values during both moulting periods and that in terms of AOA levels, the values had decreased in all moulting groups during both moulting periods ($P < 0,05$) (Table 8). Significant differences were found between the percentages of Ca and P levels of the right tibia bone specimens extracted from poultry slaughtered on day 22 ($P < 0,05$) (Table 9). At the end of the twenty-two days moulting period, differences between the mortality rates of the groups were observed and the mortality rates were

noted to be between 0% and 15.56% ($P < 0,05$) (Table 10).

The nutrient contents of the alfalfa flour used in the experiment were 17.07% Crude Protein (CP), 19.79% Crude Cellulose (CS), 6.38% Crude Ash (CA), 2.09% Crude Fat (CF) and 89.44% Dry

Matter (DM). The nutrient quantities of barley were 13.78% CP, 4.46% CS, 3.15% CA, 3.13% CF and 92.08% DM respectively.

Table 1. Composition of the experimental diets, kg/ton

Feedstuffs	Control group (<i>K</i>)&Production period diets	Low Na-Ca Diets (<i>F</i> groups)
Corn	371,81	381,33
Wheat	174,00	220,00
Sunflower meal % 36 CP	140,00	0,00
Sunflower meal %28 CP	0,00	150,00
Barley	0,00	30,00
Rasmol	30,00	90,00
Soybean meal %48 CP	34,00	94,00
Full fat soya	44,00	0,00
Canola meal	30,00	0,00
Corn bran	30,00	0,00
DDGS	30,00	0,00
Vegetable oil	10,00	0,00
DCP 18	6,74	7,50
Marbel Powder	89,00	20,00
Salt	3,50	0,00
L-Lysine HCl	1,10	1,15
DL-Methionine	0,70	0,92
Safizyme XP 20*	1,00	1,00
Karzime P 500**	0,65	0,60
Kavimix 23 15/5***	2,50	2,50
Kavimix M 1****	1,00	1,00
Analysed values		
Crude protein%	16,47	16,88
Crude cellulose %	5,01	6,06
Crude ash %	12,54	6,93
Crude fat %	4,27	3,14
Dry Matter %	88,58	88,53
Calculated values		
ME kcal/kg	2700,00	2700,00
Methionine%	0,39	0,39
Lysine%	0,74	0,74
<i>Cd</i> %	<u>3,66</u>	<u>1,10</u>
Av. P%	0,35	0,37
<i>Nd</i> %	<u>0,19</u>	<u>0,06</u>
<i>Cp</i> %	<u>0,24</u>	<u>0,04</u>
Linoleic acid%	2,23	1,29

* Endo-1,4-beta-xylanase, Kartal Kimya, Turkey: 1.400.000 U

** Fitaz, Kartal Kimya, Turkey: 500.000 FTU/g

***Vitamin Premiks, Kartal Kimya, Turkey: Each 2,5 kg premix contains: Vitamin A: 12.000.000 IU, Vitamin D₃: 2.400.000 IU, Vitamin E: 30.000 mg, Vitamin K₃: 2.500 mg, Vitamin B₁: 3.000 mg, Vitamin B₂: 7.000 mg, Vitamin B₆: 4.000 mg, Vitamin B₁₂: 15 mg, Niasin: 40.000 mg, Ca-D-Pantothenate: 8.000 mg, Folic Acid: 1.000 mg, D-Biotine: 45 mg, Vitamin C :50.000 mg, Choline Cl. : 125.000 mg, Canthaxantin: 1.500 mg, Apo-Carotenoic acid ester: 500 mg

****Mineral Premiks, Kartal Kimya, Turkey: Each 1 kg premix contains: Manganese: 80.000 mg, Iron: 40.000 mg, Zinc: 60.000 mg, Cupper: 5000 mg, Iodine: 400 mg, Cobalt: 100 mg Selenium: 150 mg, include.

Table 2. Experimental Groups

Groups		Molting Method	Feed Additives			Method&Water	
Group	Group	0-11 day	11-22 day	L-Carnitin HCl	Oregano	Method	Water
01	<i>K</i>	Negatif Control		No	No	No	Ad-libitum
02	<i>M</i>	Marbel powder	Limited Barley	No	No	withdrawal	Ad-libitum
03	<i>MC</i>	Marbel powder	Limited Barley	100 ppm	No	withdrawal	Ad-libitum
04	<i>MO</i>	Marbel powder	Limited Barley	No	%5	withdrawal	Ad-libitum
05	<i>MCO</i>	Marbel powder	Limited Barley	50 ppm	%2,5	withdrawal	Ad-libitum
06	<i>A</i>	Alfalfa powder	Alfalfa powder	No	No	No withdrawal	Ad-libitum
07	<i>AC</i>	Alfalfa powder	Alfalfa powder	100 ppm	No	No withdrawal	Ad-libitum
08	<i>AO</i>	Alfalfa powder	Alfalfa powder	No	%5	No withdrawal	Ad-libitum
09	<i>ACO</i>	Alfalfa powder	Alfalfa powder	50 ppm	%2,5	No withdrawal	Ad-libitum
10	<i>F</i>	Low Na, Ca	Low Na, Ca Feed	No	No	No withdrawal	Ad-libitum
11	<i>FC</i>	Low Na, Ca	Low Na, Ca Feed	100 ppm	No	No withdrawal	Ad-libitum
12	<i>FO</i>	Low Na, Ca	Low Na, Ca Feed	No	%5	No withdrawal	Ad-libitum
13	<i>FCO</i>	Low Na, Ca	Low Na, Ca Feed	50 ppm	%2,5	No withdrawal	Ad-libitum

Table 3. Feed Consumption of moult period (0-11 and 11-22. days)

Group	0-11. days			11-22.days	
	N	Mean	SEM	Mean	SEM
<i>K</i>	6	131,98 ^a	1,29	105,71 ^a	3,97
<i>M</i>	6	21,03 ^c	0,99	37,97 ^d	0,89
<i>MC</i>	6	26,85 ^c	3,63	37,98 ^d	1,52
<i>MO</i>	6	23,98 ^c	1,76	33,99 ^{de}	1,55
<i>MCO</i>	6	23,60 ^c	1,47	35,06 ^d	0,91
<i>A</i>	6	27,00 ^c	3,06	29,03 ^{de}	2,09
<i>AC</i>	6	23,27 ^c	3,29	23,00 ^e	3,31
<i>AO</i>	6	22,60 ^c	2,49	22,51 ^e	1,85
<i>ACO</i>	6	30,47 ^c	3,94	27,55 ^{de}	2,35
<i>F</i>	6	107,67 ^b	4,69	64,15 ^c	3,81
<i>FC</i>	6	108,32 ^b	2,91	69,61 ^{bc}	2,72
<i>FO</i>	6	104,08 ^b	4,12	79,21 ^b	1,85
<i>FCO</i>	6	108,49 ^b	4,19	77,59 ^b	1,57
<i>P</i>			0,000		

a,b,c: Means with different superscripts in each row are significantly different

Table 4. Body weight changes (g,%)

Group	N	Day 1	Day 11	Day 22	0-11. %	0-22. %
<i>K</i>	36	1532,50	1663,06 ^a	1622,78 ^a	+8,52	+5,89
<i>M</i>	36	1547,92	1180,69 ^c	1282,64 ^{ef}	-23,44	-17,14
<i>MC</i>	36	1488,47	1120,69 ^c	1259,44 ^{ef}	-24,71	-15,38
<i>MO</i>	36	1544,72	1194,31 ^c	1271,00 ^{ef}	-22,68	-14,61
<i>MCO</i>	36	1533,19	1162,50 ^c	1214,72 ^f	-24,17	-20,77
<i>A</i>	36	1540,28	1200,14 ^c	1020,64 ^g	-22,08	-33,74
<i>AC</i>	36	1499,44	1180,28 ^c	1027,50 ^g	-21,29	-31,47
<i>AO</i>	36	1495,97	1193,75 ^c	1007,08 ^g	-20,20	-32,68
<i>ACO</i>	36	1487,92	1217,78 ^c	1024,58 ^g	-18,16	-31,14
<i>F</i>	36	1506,39	1440,69 ^b	1345,00 ^{ede}	-4,36	-10,71
<i>FC</i>	36	1557,50	1481,39 ^b	1397,36 ^{bed}	-4,90	-10,29
<i>FO</i>	36	1523,89	1480,97 ^b	1513,75 ^{ab}	-2,81	-0,66
<i>FCO</i>	36	1517,78	1481,81 ^b	1434,86 ^{bc}	-2,37	-5,46
<i>P</i>		0,487	0,000	0,000		

a,b,c,d,e,f,g: Means with different superscripts in each row are significantly different.

K:Control, M: Marbel powder, MC: Marbel powder +Carnitine, MO: Marbel powder +Oregano, MCO: Marbel powder +Carnitine+Oregano A:Alfalfa, AC: Alfalfa+Carnitine, AO: Alfalfa+Oregano, ACO: Alfalfa+Oregano+ Carnitine F:Low Na-Ca, FC: Low Na-Ca+ Carnitine, FO: Low Na-Ca+Oregano, FCO: Low Na-Ca+ Oregano+ Carnitine

Table 5: Egg production of moulting period (0-11 and 11-22.day)

Group	0-11.day			11-22.day		
	Egg production %	Cracked and broken egg %	Abnormal egg %	Egg production %	Cracked and broken egg %	Abnormal egg %
<i>K</i>	64,44 ^a	21,32 ^a	4,75	65,98 ^a	19,62 ^a	0,92 ^a
<i>M</i>	12,53 ^c	6,77 ^b	3,13	0,00 ^d	0,00 ^c	0,00 ^b
<i>MC</i>	12,73 ^c	7,07 ^b	3,23	0,00 ^d	0,00 ^c	0,00 ^b
<i>MO</i>	12,83 ^c	7,47 ^b	3,54	0,00 ^d	0,00 ^c	0,00 ^b
<i>MCO</i>	10,93 ^c	6,17 ^b	2,94	0,00 ^d	0,00 ^c	0,00 ^b
<i>A</i>	9,29 ^c	5,96 ^b	2,93	0,00 ^d	0,00 ^c	0,00 ^b
<i>AC</i>	8,49 ^c	6,07 ^b	2,53	0,00 ^d	0,00 ^c	0,00 ^b
<i>AO</i>	10,50 ^c	6,77 ^b	3,13	0,00 ^d	0,00 ^c	0,00 ^b
<i>ACO</i>	9,19 ^c	6,57 ^b	2,62	0,00 ^d	0,00 ^c	0,00 ^b
<i>F</i>	49,73 ^b	22,71 ^a	2,32	34,06 ^{bc}	16,42 ^{ab}	0,83 ^a
<i>FC</i>	47,48 ^b	21,54 ^a	2,83	32,81 ^c	16,13 ^b	0,61 ^{ab}
<i>FO</i>	42,83 ^b	18,38 ^a	2,43	37,68 ^b	16,97 ^{ab}	0,51 ^{ab}
<i>FCO</i>	44,86 ^b	18,64 ^a	3,14	34,08 ^{bc}	14,99 ^b	0,30 ^{ab}
<i>P</i>	0,000	0,000	0,980	0,000	0,000	0,000

a,b,c: Means with different superscripts in each row are significantly different

Table 6. Immune response after vaccination – ND titre values (HI; 2Log)

Group	N	11.day		22.day	
		Titre	SEM	Titre	SEM
<i>K</i>	6	14,67	0,42	14,00	0,45
<i>M</i>	6	15,33	0,42	13,67	0,21
<i>MC</i>	6	16,00	0,32	14,40	0,25
<i>MO</i>	6	15,57	0,20	14,33	0,42
<i>MCO</i>	6	15,33	0,49	14,33	0,62
<i>A</i>	6	15,83	0,40	14,60	0,51
<i>AC</i>	6	14,66	0,84	13,83	0,54
<i>AO</i>	6	14,57	0,43	14,00	0,52
<i>ACO</i>	6	13,80	0,58	13,67	0,67
<i>F</i>	6	14,50	0,67	13,67	0,42
<i>FC</i>	6	14,66	0,56	13,17	0,40
<i>FO</i>	6	14,00	0,73	14,17	0,40
<i>FCO</i>	6	15,00	0,26	13,17	0,48
<i>P</i>		0,117		0,562	

Table 7. End of moulting period (22. day) some organ parameters (% Body weight)

Group	N	Live weight (g)		% Liver weight		%Spleen weight		%Digestive sys.weight		%Full of stomach		%Empty stomach		%intestine lenght	
		Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
<i>K</i>	6	1595,00 ^a	87,54	2,35 ^{ab}	0,12	0,12	0,01	9,19	0,11	2,94 ^d	0,14	2,46 ^d	0,11	11,10 ^{cd}	0,26
<i>M</i>	6	1320,00 ^{abc}	31,09	2,01 ^{ab}	0,10	0,14	0,01	11,19	0,68	4,71 ^{abc}	0,18	3,49 ^{abc}	0,10	11,72 ^{abcd}	0,70
<i>MC</i>	6	1165,00 ^{cde}	55,38	2,06 ^{ab}	0,12	0,15	0,01	12,92	0,42	4,95 ^{ab}	0,11	3,65 ^a	0,04	13,42 ^{abcd}	0,50
<i>MO</i>	6	1231,67 ^{bcd}	53,85	2,10 ^{ab}	0,06	0,15	0,01	12,63	0,62	5,11 ^{ab}	0,15	3,78 ^a	0,11	12,39 ^{abcd}	0,71
<i>MCO</i>	6	1251,67 ^{bcd}	104,76	2,06 ^{ab}	0,11	0,13	0,01	11,50	1,30	4,21 ^{abcd}	0,43	3,18 ^{abcd}	0,26	11,78 ^{abcd}	0,61
<i>A</i>	6	968,33 ^{de}	84,59	2,13 ^{ab}	0,12	0,27	0,15	12,71	1,74	3,65 ^{abcd}	0,78	3,55 ^{ab}	0,12	15,43 ^a	1,83
<i>AC</i>	6	944,17 ^{de}	63,05	2,17 ^{ab}	0,18	0,12	0,01	11,77	1,26	4,39 ^{abcd}	0,25	3,63 ^a	0,12	15,25 ^{ab}	1,03
<i>AO</i>	6	902,50 ^e	91,54	1,79 ^b	0,14	0,10	0,01	11,06	0,92	4,32 ^{abcd}	0,21	3,65 ^a	0,16	14,86 ^{abc}	1,09
<i>ACO</i>	6	970,32 ^{de}	49,90	2,30 ^{ab}	0,16	0,10	0,01	13,68	1,45	4,58 ^{abc}	0,30	3,69 ^a	0,15	14,84 ^{abc}	0,93
<i>F</i>	6	1319,17 ^{abc}	35,60	2,78 ^a	0,15	0,12	0,01	10,95	0,65	3,66 ^{abcd}	0,15	2,70 ^{bcd}	0,11	12,62 ^{abcd}	0,77
<i>FC</i>	6	1426,67 ^{abc}	43,62	2,46 ^{ab}	0,13	0,12	0,01	9,22	1,21	3,48 ^{bcd}	0,26	2,35 ^d	0,48	11,17 ^{bcd}	0,490
<i>FO</i>	6	1590,83 ^a	57,31	2,71 ^{ab}	0,08	0,12	0,01	11,81	0,46	3,43 ^{cd}	0,21	2,61 ^{cd}	0,14	10,88 ^{cd}	0,47
<i>FCO</i>	6	1516,67 ^{ab}	60,13	2,64 ^{ab}	0,09	0,13	0,01	10,29	0,33	3,25 ^{cd}	0,05	2,52 ^d	0,06	10,55 ^d	0,54
<i>P</i>		0,000		0,012		0,387		0,487		0,000		0,000		0,000	

a,b,c,d,e:Means with different superscripts in each row are significantly different

Table 8. Oxidant- antioxidant parameters

11.Day	MDA (nmol/l)			GSH (μ mol/l)		AoA(mmol/l)	
Group	N	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
<i>K</i>	6	16,25	2,42	13,55	1,23	28,78 ^a	6,50
<i>M</i>	6	17,59	1,92	17,09	1,75	7,15 ^b	2,29
<i>MC</i>	6	18,64	1,85	17,73	1,80	4,87 ^b	1,90
<i>MO</i>	6	17,26	1,33	15,63	1,28	8,47 ^b	3,41
<i>MCO</i>	6	18,37	1,70	14,88	1,41	7,70 ^b	2,61
<i>A</i>	6	18,35	1,75	14,37	1,42	5,15 ^b	1,00
<i>AC</i>	6	17,18	1,51	12,45	1,04	7,16 ^b	1,39
<i>AO</i>	6	19,03	2,35	15,03	2,06	7,92 ^b	3,49
<i>ACO</i>	6	16,93	1,77	15,60	1,90	9,29 ^{ab}	5,41
<i>F</i>	6	16,62	1,60	12,97	1,41	10,50 ^{ab}	0,17
<i>FC</i>	6	15,88	1,73	16,61	1,94	23,25 ^{ab}	5,48
<i>FO</i>	6	12,51	1,59	14,70	1,22	17,41 ^{ab}	5,96
<i>FCO</i>	6	15,53	1,44	15,10	1,75	12,97 ^{ab}	3,98
<i>P</i>		0,547		0,555		0,000	
22.Day	MDA (nmol/l)			GSH (μ mol/l)		AoA(mmol/l)	
Group	N	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
<i>K</i>	6	14,72	0,36	17,31	0,64	27,48 ^a	5,37
<i>M</i>	6	14,23	0,76	20,70	1,95	9,11 ^b	1,51
<i>MC</i>	6	15,04	1,39	19,98	1,04	6,79 ^b	1,25
<i>MO</i>	6	15,52	1,35	23,23	1,37	8,75 ^b	2,49
<i>MCO</i>	6	14,17	1,50	20,40	2,01	5,91 ^b	0,69
<i>A</i>	6	16,29	3,35	23,79	1,97	8,96 ^b	2,97
<i>AC</i>	6	15,62	2,33	24,79	2,03	5,57 ^b	0,48
<i>AO</i>	6	15,14	0,97	23,20	1,60	7,29 ^b	1,18
<i>YCO</i>	6	14,68	1,32	22,80	1,56	6,51 ^b	1,25
<i>F</i>	6	15,44	1,01	22,79	2,12	9,77 ^b	1,79
<i>FC</i>	6	15,14	0,87	20,88	1,27	11,49 ^b	3,98
<i>FO</i>	6	12,96	0,87	21,47	2,56	11,46 ^b	4,96
<i>FCO</i>	6	13,20	0,69	21,58	1,66	14,68 ^{ab}	4,41
<i>P</i>		0,956		0,268		0,000	

a,b: Means with different superscripts in each row are significantly different.

Table 9. Ca- P Levels of Tibial Ash

22.Day	Ca %			P %	
Group	N	Mean	SEM	Mean	SEM
<i>K</i>	6	15,95 ^{ab}	0,10	8,76 ^a	0,11
<i>M</i>	6	14,18 ^{abc}	0,08	6,54 ^{cd}	0,15
<i>MC</i>	6	14,21 ^{abc}	0,14	8,01 ^{abc}	0,04
<i>MO</i>	6	15,91 ^{ab}	0,15	6,62 ^{cd}	0,22
<i>MCO</i>	6	13,27 ^{bcd}	0,24	8,17 ^{ab}	0,00
<i>A</i>	6	14,30 ^{abc}	0,70	8,39 ^a	0,65
<i>AC</i>	6	11,21 ^d	0,27	8,24 ^{ab}	0,27
<i>AO</i>	6	12,13 ^{cd}	0,48	8,15 ^{ab}	0,08
<i>ACO</i>	6	12,91 ^{cd}	0,71	8,81 ^a	0,12
<i>F</i>	6	16,47 ^a	0,24	6,09 ^d	0,11
<i>FC</i>	6	14,91 ^{abc}	0,86	6,90 ^{bcd}	0,39
<i>FO</i>	6	14,73 ^{abc}	0,33	7,50 ^{abcd}	0,22
<i>FCO</i>	6	13,72 ^{abcd}	1,34	7,70 ^{abc}	0,49
<i>P</i>		0,000		0,000	

a,b,c,d: Means with different superscripts in each row are significantly different.

Table 10. Mortality rate of groups (%)

(0-22 day)			
Group	N	Mean	SEM
<i>K</i>	6	2,22 ^{bc}	1,41
<i>M</i>	6	14,39 ^{ab}	3,62
<i>MC</i>	6	12,22 ^{abc}	2,05
<i>MO</i>	6	8,89 ^{abc}	2,81
<i>MCO</i>	6	10,00 ^{abc}	5,64
<i>A</i>	6	10,00 ^{abc}	1,49
<i>AC</i>	6	12,22 ^{abc}	1,11
<i>AO</i>	6	12,22 ^{abc}	2,05
<i>ACO</i>	6	15,56 ^a	4,44
<i>F</i>	6	3,34 ^{abc}	1,49
<i>FC</i>	6	1,11 ^c	1,11
<i>FO</i>	6	0,00 ^c	0,00
<i>FCO</i>	6	2,22 ^{bc}	1,41
<i>P</i>		0,000	

a,b,c: Means with different superscripts in each row are significantly different.

DISCUSSION

Although literature content is available regarding the assessment of hybrid, age, environmental factors in forced moulting as well as yield parameters for alternative forced moulting methods and their impact on intestinal morphology and microbiology, studies dealing with feed additives in powder form supplemented in feed during moulting are practically non-existent. In a study in which feed containing 100%, 90% and 70% of alfalfa flour was used for nine days as moulting material (McReynolds et al.,2006) it was reported that the level of alfalfa flour consumption remained at a rather low level during the moulting period and in conclusion the poultry had consumed a limited amount of alfalfa flour. In a study carried out by Aygun and Yetisir (2014) was reported that moulting feed consumption by groups for which feed withdrawal was not applied was between 63.57-72.83 g. In the presented study it is evident that the feed consumption of the alfalfa flour groups is less than this value whereas the consumption of *F* groups is similar to the data of the researchers. It is reported that the targeted

live weight loss of extensively used forced moulting methods with feed withdrawal is 25-30% (Bell 1987, Brake 1992, Brake 1993). Ruzler (1998) asserts that a successful moulting program must incur a live weight loss in the range of at least between 15-40%. The live weight loss of the groups with feed withdrawal in this study ensured during the 0-11 day moulting was recorded in the range of 22.68 - 24.71% while the values recorded for the groups with feed withdrawal and alfalfa groups were in the range of 14.61% - 33%. The acquired data indicates that the live weight loss recommended by the researchers has been realized in these groups. The values found in the groups which had been given moulting feed with a low Na-Ca content, namely 10.71%; 10.29%; 0.66% and 5.46% were less than the values suggested by the researchers. Bell and Kuney (1992) reported a live weight loss of 24.5%-28.8% with poultry which had been treated with feed withdrawal moulting. These values are similar to the values calculated for the *M* groups on the 11th day. It has been reported that providing water and organic acid to animals undergoing the feed withdrawal method did not effect live weight loss and that during 9 days of

moulting a live weight loss of 25%-26% had been achieved in the groups (Kubena et al. 2005). In a study carried out by Kucukyilmaz et al. (2003) with white laying hens a live weight loss of 23.21% was reported at the end of 8 days of fasting, the percentage was 26.43% after 12 days of fasting and 32.66% at the end of 16 days of fasting. The live weight losses in our feed withdrawal groups in the level of 22.68%- 24.71% are commensurate with the 11 day fasting period values. These values are also similar to the research results of poultry moulted by starving (Mc Cormick and Cunningham 1984, Mc Cormick and Cunningham 1987, Hurwits et al. 1998). An assessment of the live weight losses for 0-22 days of the study reveal that the values for groups *M* and *A* were higher than the values of 8.20%-15.00 reported by Biggs et al (2003) for moulting groups based on maize and wheat bran, they were similar to groups *F* and *FC* and higher than the figures for groups *FO* and *FCO*. It can be said that the differences between the results are due to the different feeds used in the moulting and the duration of the application. During the 0-11 day period of the moulting in the present study, live weight losses in the alfalfa flour groups were found to be in the range of 18.16% - 22.08%. In a study in which alfalfa flour was used in the form of pellets and powder as moulting material (Landers et al. 2005b), a live weight loss on the level of 15.2%- 23.3% was reported. The difference is thought to be attributable to the particle size of the alfalfa flour, the duration of the moulting and environmental conditions. In a study carried out by Kim et al. (2007), moulting feed containing alfalfa at different rates was used in a feed withdrawal method and live weight losses of 28.2% was reported for the feed withdrawal group while the other groups achieved a live weight loss of between 18.8% - 25.4%. These results are similar to the values obtained on the 11th day for groups *M* and *Y* in our study. At the end of the twenty-second day it is concluded that our values for groups *Y* were higher than the study data of the aforementioned values while the values of groups *F* were less. It can be constructed that the difference manifested at the end of the moulting on the 22nd day is due to the duration of the moulting, moulting feed consumption and the difference in the raw nutrient substance composition of the moulting feed in terms of groups *F*. The presented study results are commensurate with the study findings in a moulting study carried out using maize without salt, P and added vitamins (Bell, 2005) in which rather low live weight losses compared to the losses incurred by classical feed withdrawal method were reported. Although the live weight losses incurring on the 22nd day in groups *F* and *FC* and the values indicated for the 3rd and 4th weekends of the same study are similar, the values recorded for

groups supplemented with thyme display a difference. Based on these data, it is considered that the negative effect of a salt-free diet on live weight is eliminated with the addition of Oregano. When the percentage of liver weight in the study is evaluated, it is evident that the percentage of liver weight in group *AO* is significantly lower. This result is consistent with the results reported by Donalson et al. (2005) that the percentage of liver weight reported in groups consuming alfalfa flour was significantly lower than the percentage of liver weight noted in the control group in studies in which alfalfa was used as a moulting material on various levels. The findings of the researchers that a difference is not formed between the groups in terms of the percentage of spleen weight are similar to those of the researchers. An examination of the egg yield during the moulting period of the study revealed that egg yields were similar between the alfalfa groups and the feed withdrawal groups and significantly lower than the figures for groups *F*. The results for groups *F* are consistent with the yields for groups without feed withdrawal reported by Aygun and Yetisir (2014) while the results for groups *A* were different. It is believed that the different egg yield values manifested in the trial are due to the variety of the moulting feed and difference between consumption. Szabo et al. (2005) reported that relative liver weight decreased strikingly at the end of 12 days of fasting while tissue MDA levels increased significantly due to membrane lipid degradation. Sandhu et al. (2007) carried out a study which assessed the immunological impact of feed withdrawal moulting and Zn induced moulting programs and reported that Zn supplementation enhances the humoral immune response. In another study conducted by Alodan and Mashaly (1999), in which the immunological effects of moulting were evaluated, it was concluded that using alternative methods and feed additives did not affect the immunological response induced by vaccination and that similar titers were observed in non-moulted animals. It has been concluded that alternative moulting applications have a lesser negative impact on bone mineral concentration and density compared to starving methods (Mazzucco and Hester 2005). Ca and P percentages for the tibia have been assessed in the present study and it is evident that the moulting method and feed supplements used have had an impact on the amount of these minerals. When a comparison of the bone Ca amounts of the feed withdrawal groups and the alfalfa flour groups during the moulting period, in view of the findings of the trial, it is evident that the deposits in group *AC* are lower than the amounts of the feed withdrawal groups and groups *A*, *AO* and *ACO*. In view of these data it can be asserted that the addition of L-Carnitine alone to alfalfa flour groups

had a decreasing impact on Ca deposits. Furthermore, bone Ca deposits were found to be similar in the groups with feed withdrawal and low Na-Ca ration consuming groups. In terms of phosphorus deposition, it was concluded that the value measured in the L-Carnitine supplemented group (*MC*) is similar to the alfalfa flour groups and control group. The addition of Oregano alone seems to have significantly reduced the P deposition in the feed withdrawal group (*MO*) and in the feed withdrawal group without feed supplementation (*M*). Hence, it can be concluded that the addition of L-Carnitine in group *M* has increased the P deposit.

At the end of the 22-day moulting period, differences between mortality rates of the groups were observed, mortality rates were between 0% and 15.56%. When these rates are compared with the mortality rates reported by Biggs et al. (2004) for programs without feed withdrawal (0-2.4%) it is evident that this value range is commensurate with the results for groups *FC*, *FO* and *FCO* and considerably less than the results for group *F* and the alfalfa flour groups. When the results are compared with the mortality values reported by Petek (2001) for groups without feed withdrawal it is evident that the results for groups *FC*, *FO* and *FCO* are low whereas the values for group *F* and the alfalfa flour groups are higher than this value. The results of the study are not commensurate with those of Aygun and Yetisir (2014), which indicated that there was no difference between the mortality rates of the groups without feed withdrawal. This result suggests that the group feed consumptions during the moulting period could have been insufficient. Kucukyilmaz et al. (2003) reported that the viability of white laying hens which had been subjected to different fasting periods was 90.68% in group *K* during the yield period and between 92.29% and 94.73% in the experimental groups. These values are less than the values reached in the study. This may be due to the fact that the poultry used in the study have a lower yield age.

The study concluded that the feed consumption of *M* groups in the study were similar to group *K* and differed from the report that manifested increased feed consumption of white layer hens which had been moulted by the application of different periods of fasting (Kucukyilmaz et al. 2003). Molino et al. (2009) carried out a study comparing the efficiencies of feed withdrawal programs and feed restriction programs and concluded that the group averages were similar in terms of feed consumption.

CONCLUSION

In the light of this data, it can be said that qualitative feed restriction with alfalfa flour causes

more than 30% of live weight loss and causes more weight loss than the live weight loss obtained with the 11-day conventional feed withdrawal method. It is safe to say that because of ongoing egg-laying, a 22 day moulting period is not adequate when feed with low Na-Ca is used as a moulting material. In this application, it can be said that the addition of Oregano inhibits the loss of live weight and it may be more beneficial not to use it. A review of the viability during the moulting period indicates that feed supplements had a positive impact on the viability of *M* groups and that the application of alfalfa flour and feed withdrawal method had a similar mortality. The forced moulting methods used in the trial did not have an impact on the immune response induced with vaccination against Newcastle disease. As a result it is concluded that using alfalfa flour supplemented with various additives as an alternative to the feed withdrawal method and that adding L-Carnitine and Oregano together into alfalfa flour has a positive impact on performance in terms of animal welfare.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by BAPK of University of Afyon Kocatepe. Project Number: 07.VF.002. The authors thank to AKÜ BAPK.

REFERENCES

- Alodan MA, Mashaly, MM.** Effect of Induced Molting in Laying Hens on Production and Immune Parameters. *Poult. Sci.* 1999; 78: 171- 177.
- AOAC** Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 14th ed., Inc., Arlington, Virginia. 1984.
- Aygun A, Yetisir R.** Effects of Hen Age and Force Molting Programs on Some Egg Quality Traits in Laying Hens. *Selcuk J Agr Food Sci*, 2014.28(2):58-62
- Baratta MT, Dorman HJD, Deans SG, Biondi DM, Ruberto G.** Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *J. Essent. Oil Res.*1998;10:618-627.
- Bell DD, Kuney DR.** Effect of fasting and post-fast diets on performance in molted flocks. *J. Appl. Poult. Res.*1992; 1:200–206.
- Bell DD.** Is molting still a viable replacement alternative. *Poult. Trib.*1987; 93:32-35.
- Bell DD.** An alternative molting procedure. UC research for Non-feed-removal molting. (A supplement to “Farm Evaluation of Alternative Molting Procedures”: Bell, D.D.,

- and D.R. Kunej, (2004). *J. Appl. Poult. Res.* 13: 673-679. 2005;[web: <http://animalscience.ucdavis.edu/avian/pip41.pdf>].Erişim: 08/2011.
- Berry WD.** The physiology of induced molting. *Poult. Sci.*2003; 82: 971-980.
- Beutler E, Gelbart T, Pegelow C.** Erythrocyte glutathionesyntetase deficiency leads not only to glutathione but also toglutathione-S-transferase deficiency. *J. Clin. Invest.*1986; 77: 38-41.
- Biggs PE, Persia ME, Koelkebeck KW, Parsons CM.** Further evaluation of nonfeed removal methods for molting programs. *Poult. Sci.*2004; 83:745-752
- Biggs PE, Douglas MW, Koelkebeck KW, Parsons CM.** Evaluation of nonfeed removal methods for molting programs. *Poult. Sci.* 2003; 82:749–753.
- Brake JT.** Mechanisms of and metabolic requirements for complete and rapid reproductive rejuvenation during an induced molt—a brief review. *Ornis Scand.* 1992; 23:335–339.
- Brake JT.** Recent advances in induced molting. *Poult. Sci.*1993; 72:929–931.
- Buyse J, Janssens GP, Decuypere E.** The effects of dietary L-carnitine supplementation on the performance, organ weights and circulating hormone and metabolite concentrations of broiler chickens reared under a normal or low temperature schedule, *Brit. Poult. Sci.* 2001; 42 (2): 230-241.
- Donalson LM, Kim, WK, Woodward CL, Herrera P, Kubena LF, Nisbet DJ, Ricke SC.** Utilizing different ration of alfalfa and layer ratios for molt induction and performance in commercial laying hens. *Poult. Sci.* 2005; 84:362–369.
- Draper HH, Mcgirr LG, Hadley M.** The metabolism ofmalondialdehyde. *Lipids.*1986; 21, 305-307.
- Ergün A, Tuncer ŞD, Colpan I, Yalcin S, Yildiz G, Kucukersan MK, Kucukersan S, Sehu A, Yemler Yem Hijyeni ve Tek.** 2004; 2. Baskı, Ankara, Pozitif Mat. ISBN: 975-97808-0-1pp:263-305.
- Gulhan T, Oztabak K, Hasret D, Toker N, Matur E.** The effect of vitamin E on cellular immune responses in laying hens forced-moulted by different methods. *Arch. Geflügelk.* 2006;70 (1): 28–34.
- Harmayer J.**The physiological role of L-carnitine. *Lohmann Information.*2002; 27:1-8.
- Hrnčár C, Verguliaková S, Svorad P, Weis J, Arpášová H, Mindek S, Fik M, Bujko J.** 2015; Effect of L-carnitine supplementation on fattening and carcass parameters of broiler chickens
- Hurwitz S, Wax E, Nisenbaum Y, BenMoshe M, Plavnik I.** The response of laying hens to induced molt as affected by strain and age. *Poult. Sci.* 1998; 77:22–31.
- Kim WK, Donalson LM, Michell AD, Kubena LF, Nisbet DJ, Ricke SC.** Effects of alfalfa and fructooligosaccharide on molting parameters and bone qualities using dual energy x-ray absorptiometry and conventional bone assays. *Poult Sci.*2006; 85:15-20.
- Kim WK, Donalson LM, Bloomfield SA, Hogan HA, Kubena LF, Nisbet DJ, Ricke SC.** Molt Performance and Bone Density of Cortical, Medullary, and Cancellous Bone in Laying Hens during Feed Restriction or Alfalfa-based Feed Molt. *J. Poult. Sci.*2007; 86:1821-1830.
- Koelkebeck KW, Anderson KE.** Molting layers- Alternative methods and their effectiveness. *Poultry Sci.* 2007; 86: 1260-1264.
- Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S, Cosic V.** Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *J. Clin. Path.* 2001; 54:356-361.
- Kubena LF, Byrd JA, Moore RW, Ricke SC, Nisbet DJ.** Effects of drinking water treatment on susceptibility of laying hens to Salmonella enteritidis during forced molt. *Poult. Sci.* 2005; 84(2):204-211.
- Kucukyilmaz K, Erensayın C, Orhan H.** Zorlamalı tüy döktürülen yumurta tavuklarında değişik açlık sürelerinin yumurta verim performansı ile yumurta iç ve kabuk kalite kriterleri üzerine etkileri. *Akdeniz Üniv Ziraat Fak Derg,* 2003; 16(2):199-210.
- Lambert RJW, Skandamis PN, Cootel PJ, Nychas GJE,** A study of the minimuminhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J.Appl. Microbiol.*2001; 91:453-462.
- Landers, K. L., Moore, R. W., Dunkley, C. S., Herrera, P., Kim, W. K., Landers, D. A., Howard ZR, McReynolds JL, Byrd JA, Kubena LF, Nisbet DJ, Ricke SC.**

- Immunological cell and serum metabolite response of 60-week-old commercial laying hens to an alfalfa meal molt diet. *Bioresour. Technol.* 2008; 99(3):604-608.
- Landers KL, Howard ZR, Woodward CL, Birkhold SG, Ricke SC.** Potential of alfalfa as an alternative molt induction diet for laying hens: Egg quality and consumer acceptability. *Bioresour. Technol.* 2005b; 96:907-911.
- Kakhki RAM, Mousavi Z, Anderson KE.** An appraisal of moulting on post-molt egg production and egg weight distribution in white layer hens; meta-analysis. *Brit. Poult. Sci.* 2018.59 (3). DOI:10.1080/00071668.2018.1432032
- Lien TF, Horng YM.** The effect of supplementary dietary L-carnitine on the growth performance, serum components, carcass traits and enzyme activities in relation to fatty acid beta-oxidation of broiler chickens, *Brit. Poult. Sci.* 2001;42 (1): 92-95.
- Mazzuco H, Hester PY.** The effect of an induced molt using a nonfasting program on bone mineralization of White Leghorns. *Poult. Sci.* 2005; 84:1483-1490.
- McCormick CC, Cunningham DL.** Performance and physiological profiles of high dietary zinc and fasting as methods of inducing a forced rest: A direct comparison. *Poult. Sci.* 1987; 66:1007-1013.
- McCormick CC, Cunningham DL** Forced resting by high dietary zinc: Tissue zinc accumulation and reproductive organ weight changes. *Poult. Sci.* 1984; 63:1207-1212.
- McReynolds JL, Moore RW, Kubena LF, Byrd JA, Woodward CL, Nisbet DJ, Ricke SC.** Effect of various combinations of alfalfa and Standard layer diet on susceptibility of laying hens to *Salmonella enteritidis* during forced molt. *Poult. Sci.* 2006; 85(7):1123-8.
- Minoura M, Ohguchi H, Ito H, Noda K, Kato Y.** Investigation on induced molting without fasting by feeding the diets which were mainly composed of the wheat bran or the defatted rice bran in hens. *Research Bulletin of the Aichi-ken Agricultural Research Center*, 2005; 31: 173-179 (sum.).
- Molino AB, Garcia EA, Berto DA, Pelícia K, Silva AP, Vercese F.** The effects of alternative forced-molting methods on the performance and egg quality of commercial layers. *Brazilian Journal of Poultry Science.* 2009; 11,2: 109 - 113.
- NRC** 1994. (National Research Council) Nutrient requirement of poultry. 9th Revised Edition, National Academy Press, Washington, DC.
- Petek M.** Değişik Zorlamalı Tüy Dökümü Programlarının Ticari Yumurtacı Tavuklarda Başlıca Verimler Üzerine Etkisi. *U.Ü.Vet. Fak. Derg.* 2001;20: 39-44.
- Rabie MH, Szilagyi M, Gippert T, Votisky E, Gerendai D.** Influence of dietary L-carnitine on performance and carcass quality of broiler chickens. *Acta. Biol. Hung.* 1997a; 48: 241-252.
- Ruszler, P.** (1998). Health and husbandry considerations of induced molting. *Poult. Sci.* 77, 1789-1793.
- Sandhu MA, Rahman ZU, Rahman SU, Hassan IJ.** Dynamics of innate immun response in *Gallus domesticus* using two methods of induced molting. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2007;120:106-114.
- SAS** 2002. JMP™5.0.1a Statistical and Graphic Guide. A Business Unit of SAS 1989-2002. Cary, NC, USA.
- Si H, Hu J, Liu Z, Zeng ZL.** Antibacterial effect of oregano essential oil alone and in combination with antibiotics against extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *FEMS Immunol. Med. Mic.* 2008; 53:190-194.
- Senkoğlu, N.** 2001. Modern Tavuk Üretimi 3. Baskı, Anadolu Matbaası, ISBN: 975-93691-2-5, Bölüm:14, Tekirdağ.
- Szabo A, Febel H, Mezes M, Horn P, Balogh K, Romvari R.** Differential utilization of hepatic and myocardial fatty acids during forced molt of laying hens. *Poult. Sci.* 2005; 84:106-112.
- Turkoglu M, Arda M, Yetisir R, Sarica M, Ersayin C.** 1997 "Tavukçuluk Bilimi", Otak Form Ofset, ISBN: 975-94647-0-5, Samsun.
- Webster AB.** Physiology and behavior of the hen during induced molt. *Poult. Sci.* 2003; 82:992-1002.
- Xu ZR, Wang MQ, Mao HX, Hu CH.** Effect of L-Carnitine on growth performance, carcass composition and metabolism of lipid in male broilers, *Poult. Sci.* 2003; 82: 408-413.
- Zhai W.** 2007. The effect of L-carnitine supplementation on reproductive traits of White leghorns, PhD thesis, Purdue University-USA.

Afyon Manda Kaymağı ve Kaymakaltı Sütlerinde Bazı Ağır Metallerin ICP-MS ile Araştırılması[#]

Fahriye KAN^{1*}, İsmail KÜÇÜKKURT¹

¹Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Afyonkarahisar

[#]Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu 13. SAĞ. BİL. 19 proje numarasıyla desteklenmiş, yüksek lisans tezinden (AKÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2015-007) derive edilmiş ve 7. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresinde poster olarak sunulmuştur.

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

ÖZ

Endüstri gelişimine bağlı ortaya çıkan ve artarak devam eden ağır metal kirliliğinin süt ve süt ürünlerine bulaşması doğrudan ve dolaylı yollardan olabilmektedir. Bu çalışma, Afyonkarahisar ilinin bazı bölgelerinden toplanan manda sütlerinin kaynatılması ile elde edilen kaymak ve kaymakaltı sütlerinde olası ağır metal varlığının ICP-MS cihazı ile araştırılması amaçlanmıştır. Afyonkarahisar ilinin beş farklı bölgesinden toplanan elli adet süt örneği 200 ml'lik cam kavanozlara alındı. Süt numunelerinin laboratuvar ortamında beherler içinde kaynatılması ile kaymak ve kaymakaltı sütleri elde edildi. Yaş yakma yöntemiyle numuneler çözünürleştirildikten sonra ağır metal miktarları ICP-MS cihazıyla tayin edildi ve sonuçlar literatür bilgileriyle karşılaştırılarak değerlendirildi. Araştırmada kaymaktaki ortalama krom (Cr), mangan (Mn), demir (Fe), kobalt (Co), nikel (Ni), bakır (Cu), çinko (Zn), arsenik (As), selenyum (Se), molibden (Mo), gümüş (Ag), kadmiyum (Cd), baryum (Ba) ve kurşun (Pb) değerleri sırasıyla: 0,36 mg/kg, 0,56 mg/kg, 2,72 mg/kg, 0,08 mg/kg, 0,65 mg/kg, 0,09 mg/kg, 8,27 mg/kg, 0,14 mg/kg, 0,94 mg/kg, 0,00 mg/kg, 0,00 mg/kg, 0,00 mg/kg, 0,17 mg/kg, 0,01 mg/kg; kaymak altı sütünde ise 0,02 mg/L, 0,13 mg/L, 0,52 mg/L, 0,02 mg/L, 0,12 mg/L, 0,02 mg/L, 2,37 mg/L, 0,04 mg/L, 0,17 mg/L, 0,04 mg/L, 0,00 mg/L, 0,00 mg/L, 0,13 mg/L, 0,01 mg/L düzeylerinde tespit edildi. Sonuç olarak manda sütlerinden elde edilen kaymak ve kaymakaltı sütlerinde insan sağlığı açısından zararlı olabilecek bir ağır metal kontaminasyonunun bulunmadığı görüldü. Bu çalışma ağır metallerin kaymakaltı sütünden ziyade kaymakta görülmesi nedeniyle kaymak yapımında kullanılan sütlerin ağır metal yönünden risk oluşturmaması için sütlerin kontaminasyonlarının önlenmesinin önemini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Afyonkarahisar, Afyon Manda Kaymağı, Ağır Metal, ICP-MS, Kaymakaltı Sütü.

Investigation of Some Heavy Metals with ICP – MS in Afyon Buffalo Kaymak and Skimmed Milk

ABSTRACT

According to industrial development heavy metal pollution affects milk and milk products directly and indirectly. It was aimed to evaluate occurrence of heavy metal in kaymak and skimmed milk, produced from boiled Anatolian buffalo milk and obtained from Afyonkarahisar, measurement performed by means of ICP-MS. Totally 50 milk samples were collected from 5 different regions of Afyonkarahisar. To get kaymak and skimmed milk, samples were boiled in beakers under laboratory circumstances. Samples were dissolved according to wet digestion method afterwards quantity of heavy metals were determined by ICP-MS and obtained results were compared with literature values. In the study, average values of chromium (Cr), manganese (Mn), iron (Fe), cobalt (Co), nickel (Ni), copper (Cu), zinc (Zn), arsenic (As), selenium (Se), molybdenum (Mo), silver (Ag), cadmium (Cd), barium (Ba) and lead (Pb) were determined in clotted cream: 0,36 mg/kg, 0,56 mg/kg, 2,72 mg/kg, 0,08 mg/kg, 0,65 mg/kg, 0,09 mg/kg, 8,27 mg/kg, 0,14 mg/kg, 0,94 mg/kg, 0,00 mg/kg, 0,00 mg/kg, 0,00 mg/kg, 0,17 mg/kg, 0,01 mg/kg; in skimmed milk: 0,02 mg/L, 0,13 mg/L, 0,52 mg/L, 0,02 mg/L, 0,12 mg/L, 0,02 mg/L, 2,37 mg/L, 0,04 mg/L, 0,17 mg/L, 0,04 mg/L, 0,00 mg/L, 0,00 mg/L, 0,13 mg/L, 0,01 mg/L respectively. Kaymak and skimmed milk obtained from Anatolian buffaloes milk did not have heavy metal contamination that may be harmful to human health. This study shows the importance of preventing heavy metal contamination of milk used for making kaymak because this contamination is important in kaymak than skimmed milk

Keywords: Afyonkarahisar, Anatolian buffalo kaymak, heavy metals, ICP-MS, skimmed milk.

To cite this article: Kan F. Küçük Kurt İ. Afyon Manda Kaymağı ve Kaymakaltı Sütlerinde Bazı Ağır Metallerin ICP-MS ile Araştırılması. Kocatepe Vet J. (2018) 11(4): 447-453.

GİRİŞ

Kaymak, Türkiye'ye has geleneksel bir ürün olup en iyi kaymak yağ oranı yüksek, kuru madde bakımından zengin ve kaymak bağlama yeteneğinin yüksek olması sebebiyle manda sütünden yapılmaktadır. Kaymak; kadayıf, baklava gibi tatlılar üzerine konulup süsleme ve tat verme amacıyla yenilmesi yanında kahvaltılarda da tüketilmek üzere değişik şekilde ve ambalajlar içerisinde sunulan bir üründür (Akalın ve ark., 2006).

Çeşitli süt ürünlerinin üretiminde önemli bir kalite kriteri olan süt yağı Türkiye'de bazı yöresel süt ürünlerinin üretiminde kaymak yapımında kullanılır. Özellikle Afyon, Edirne, Kocaeli, İstanbul, Bursa, Ankara illerinde genellikle küçük aile işletmelerinde üretilir ve "Lüle Kaymağı" olarak satılır (Kurt ve Özdemir, 1988 ; Çon ve ark., 2000). Ayrıca kaymak Afyon yöresinde lokumun içerisine sarılarak kaymaklı lokum şeklinde tüketilmektedir (Adam, 1971). Kaymak üretiminde çeşitli hayvan sütleri kullanılmakla birlikte daha çok manda sütü tercih edilir. Manda sütünün yağ ve kuru madde miktarının yüksek olması ve yağ renginin de beyaz olması kaymak üretiminde tercih edilmesinin başlıca nedenidir (Tekinşen, 2000).

Atmosferdeki değişik gaz ve parçacıkların fazlalığı, fabrika bacalarından çıkan hava kirleticiler ve atıkları toprak ve bitki verimliliğine olumsuz etkide bulunmakta ve bitkilerle beslenen insan ve hayvanları olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Özellikle yirminci yüzyılın ikinci yarısında endüstri gelişimine bağlı olarak ortaya çıkan ve artarak devam eden hava ve ağır metal kirliliği artmış olup günümüzde bütün canlılar üzerinde tehdit oluşturmaktadır (Zheljzkov ve Nielsen, 1996). Ağır metal grubuna kurşun (Pb), kadmiyum (Cd), demir (Fe), kobalt (Co), bakır (Cu), nikel (Ni), civa (Hg) ve çinko (Zn) başta olmak üzere 60'tan fazla metal dahildir (Kahvecioğlu ve ark., 2003). Zehirleyici özelliğe sahip ağır metaller çeşitli kaynaklardan çevreye yayılmakta ve günümüzde çevre kirliliğinin önemli nedenlerinden birini oluşturmaktadır (Goyer, 1991). Su, toprak ve havanın kirlenmesiyle birlikte ekolojik dengenin bozulması sonucu gıda maddelerine geçen ağır metaller insan sağlığını tehdit etmekte ve bu gelecek kuşaklara da geçebilmektedir. Ağır metallerin süt ve süt ürünlerine bulaşması; süt ürünlerinin sağladığı kaplar, süt taşımada kullanılan tanklar, süt ürünlerinin hazırlandığı ortamlar gibi doğrudan olabilir. Ya da farklı kaynaklardan çevreye bulaşan atıkların ağır metal içeriklerinin hayvanın tükettiği yeme ulaşması, hayvanın içtiği su, soluduğu hava gibi dolaylı yollardan da olabilir.

Yapılan bu çalışma ile Afyonkarahisar'da bulunan bazı bölgelerden toplanan manda sütünün kaynatılması ile elde edilen kaymak ve kaymakaltı sütlerinde ağır metal varlığının ICP-MS cihazı ile araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL- METOT

Örneklerin alınması

Manda sütleri, Afyonkarahisar il ve ilçelerinden 5 farklı bölgeden toplam 50 adet cam kavanozlara 200 ml olarak toplandı. Süt örneklerinin alındığı ve kaymak üretimi yapılan malzemeler 1:1 HNO₃ çözeltisinde 12 saat bekletildikten sonra ultra distile su (ELGA DV 25) ile yıkandı ve kurutuldu.

Kaymak Üretimi

Sütler toplandıktan sonra bekletilmeden beherlerde bek üzerinde yaklaşık 30 dk süre ile 95°C'ye gelinceye kadar ısıtıldı. Isıtma işlemi sonrası beherler oda sıcaklığında 1-2 saat soğumaya bırakılarak ardından +4 °C'de 12-14 saat bekletildi. Süre sonunda oluşan kaymak tabakası yine cam kavanozlara alındı.

Örneklerin Hazırlanması

Kaymak ve kaymakaltı sütü örneklerinin çözünme işlemleri için kapalı sistem mikrodalga yakma metodu kullanıldı. Sineo MDS- 10 marka mikrodalga kapalı sistemde HP-100 teflon kaplar kullanıldı. Kaymakaltı sütü örneği için; her bir teflonu önce mikropipet yardımıyla süt örneğinden 2 ml alındı ve üzerine 8 ml % 65'lik HNO₃ eklendi üzerine 1 ml %30'luk H₂O₂ eklendikten sonra 15-20 dk bekletildi. Teflon kapların kapakları sıkıştırılarak çözündürme işlemi için 130 °C 'de 10 dk, 150 °C 5 dk ve 180 °C'de 10 dk şeklinde yağ yakma cihazında yakma işlemi uygulandı. Kaymak örneği için; önce 0,5 g kaymak hassas terazide tartılarak teflon kaplara alındı ve üzerine 6 ml HNO₃ eklendi. 15 dakika ön muameleden sonra 3 ml HNO₃ ve üzerine 1 ml H₂O₂ eklendi. Çözünürleştirme için yağ yakma cihazında 130 °C'de 10 dk, 150 °C'de 5 dk, 180 °C'de 15 dk şeklinde sıcaklık dereceleri ayarlanarak yağ yakma yöntemi uygulandı.

ICP – MS ile Ölçüm

Çözünürleştirme işlemi sonrası oda sıcaklığında soğutulan kapların kapakları açıldıktan sonra teflondan çözünmüş çözeltiler 50 ml'lik balon jöjelere alındı. Çözeltiye 50 ml ultra distile su eklenerek seyreltme işlemi gerçekleştirildi ve örnekler plastik tüplere alındı. Daha sonra örnekler 25/0,45 µm'lik filtrelerden (econofilter) süzülme ve okuma işlemine kadar buzdolabında +4 °C'de bekletildi. Metal kontaminasyonunu önlemek amacıyla örneklerin çözündürülmesi esnasında

kullanılan tüm malzemeler, HNO₃ (1:1) ve ultra distile su (1/9)'dan geçirildi. Ağır metal analizlerinin gerçekleştirilmesi için Agilent 7700 seri ICP-MS cihazı kullanıldı.

BULGULAR

Toplanan sütlerden elde edilen kaymak ve kaymakaltı sütlerinin minimum, maksimum, ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 1'de verilmiştir. Buna göre Ag ve Cd kaymakta ve kaymakaltı sütünde tespit edilebilir değerin altında bulundu. Manda sütünden elde edilen kaymakların hiçbirisinde Mo ağır metali tespit edilmedi fakat kaymakaltı sütünde Mo varlığı tespit edilmiştir. Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Cd, ve Ba kaymaktaki ortalama değerleri kaymak altı sütüne göre daha fazla olduğu tespit edildi. Pb kaymakta ve kaymak altı sütünde ortalama değerleri aynı iken standart sapma ve maksimum değeri kaymak altı sütünde daha yüksek olduğu görüldü.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Araştırmada elde edilen bulgular incelendiğinde Cr değerlerinin kaymakta 0,36 mg/kg ve kaymakaltı sütünde 0,02 mg/L olarak tespit edildi. Soylu ve Temiz (2011) Samsun bölgesinde yaptıkları çalışmada sığır süt örneklerinde Cr'u 0,03 mg/kg olarak bulmuşlardır. Öksüztepe ve ark. (2013), 25 çökelek ve 25 kurut olmak üzere toplam 50 numuneden oluşan çalışmalarında Cr seviyelerini çökelekte 0,06 mg/kg ve kurut örneklerinde 0,09 mg/kg olarak saptamışlardır. Her iki çalışmadaki Cr miktarları yapılan çalışmada elde ettiğimiz kaymaktaki değerden düşük; kaymakaltı sütü örneklerinin değerlerinden yüksek olduğu görüldü. Aslam ve ark. (2011), Pakistan'da yaptıkları çalışmada keçi ve sığır sütlerindeki ağır metal varlığını mevsimsel olarak incelemişler ve toplamda hayvanların sütlerinde Cr miktarlarını keçilerde 1,277 mg/L, sığırlarda 1,199 mg/L olarak yüksek seviyelerde bulmuşlardır. Bunun sebebinin toprak yapısı, otlakların sanayi bölgelerine yakın olması ve sütün elde edilmesi sırasında meydana gelen kontaminasyonlardan olabileceğini belirtmişlerdir. Aynı yönde Temurci ve Güner (2006), sütte Cr ortalama değerini 1,02 mg/kg ve peynirde 2,60 mg/kg olarak bulmuşlardır. Süt ve peynirdeki yüksek değerlerdeki Cr'un süt ve peynir üretiminin muhafazasında kullanılan kaplardan kaynaklanabileceğini düşünmüşlerdir. Afyonkarahisar'da manda kaymak ve kaymakaltı sütlerinde önemli bir Cr kirliliğinin olmadığı söylenebilir.

Kaymakta Mn 0,56 mg/kg, kaymakaltı sütünde 0,13 mg/L olarak tespit edildi. Samsun'da sanayi

emisyonlarının yöre sığır sütlerinin ağır metal içeriğine etkisinin araştırıldığı çalışmada Mn'in ortalama miktarı 0,048 mg/kg olarak bildirilmiştir. Enb ve ark. (2009), manda ve inek sütü ile yaptıkları çalışmada manda sütlerinde Mn miktarını 0,076 mg/kg inek sütlerindeki Mn miktarını ise 0,056 mg/kg olarak tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada çeşitli süt ürünlerinden kaymak, tereyağ gibi süt ürünlerinde Mn miktarları en yüksek tereyağında 0,316 mg/kg, kremada ise 0,234 mg/kg olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmamızdaki bulgular dikkate alındığında kaymakta tespit edilen Mn değerlerinin bu çalışmalardan yüksek olduğu görülmektedir. Öksüztepe ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada ise Elazığ'da tüketime sunulan çökelek ve kurut örneklerinde çökelekte 0,41 mg/kg kurutta 1,25 mg/kg düzeyinde Mn olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada bulunan değerler yapılan çalışma ile uyumlu görülmektedir.

Elde edilen bulgular Fe yönünden incelendiğinde kaymakta 2,72 mg/kg ve kaymakaltı sütünde 0,52 mg/L olarak tespit edildi. Temurci ve Güner (2006)'in Ankara'da süt ve beyaz peynirlerde ağır metal kontaminasyonu üzerine yaptıkları çalışmada sütte ortalama Fe değerini 52,19 mg/L ve peynir numunelerinde 62,56 mg/kg olarak bulmuşlardır. Yalçın ve Tekinşen (2010) beyaz salamura, tulum ve kaşar peynirlerinin Fe içeriklerini sırasıyla 17,47 mg/kg, 14,18 mg/kg ve 15,42 mg/kg olarak saptamışlardır. Bu çalışmalardaki yüksek Fe değerlerinin topraktaki demir içeriğinden, ürünlerin metal kaplarda muhafaza edilmesinden ve elle yapılan sağımdan kaynaklanabileceğini söylemişlerdir. Özlü ve ark. (2012), taze ve olgunlaşmış kaşarlarda Fe değerlerini sırasıyla 1,71 mg/kg ve 1,49 mg/kg olarak bulmuşlardır. Soylu ve Temiz (2011), sığır sütlerinde ortalama Fe miktarını 0,39 mg/kg olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmalar sütte ve süt ürünlerinde Fe değerlerinin farklı miktarlarda olabileceğini göstermekle birlikte yapılan çalışma ile uyumlu olarak süttten ziyade süt ürünlerinde Fe'in daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Kaymakta Co 0,08 mg/kg ve kaymakaltı sütünde 0,02 mg/L olarak tespit edildi. Kılıçel ve ark. (2004), otlu lorlarda Co içeriğini ortalama 0,29 mg/kg, Benincasa ve ark. (2008) ise manda sütünde Co ortalama değerini 2,10 µg/kg ve inek sütünde 1,44 µg/kg olarak bulmuşlardır. Her iki çalışmadaki Co değerleri yapılan çalışmada elde edilen değerlerden yüksek bulunmuştur. Co değerlerinin yapılan çalışmada düşük olması insan sağlığı açısından olumlu bulunmaktadır.

Tablo 1. Toplam Kaymak ve Kaymakaltı Sütünde Ağır Metal Düzeyleri (mg/kg, mg/L)**Table 1.** Heavy Metal Levels in Total Kaymak and Scimmed Milk(mg / kg)

	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Mo	Ag	Cd	Ba	Pb	
Kaymak	X±Sx	0,36±0,48	0,56±0,69	2,72±3,57	0,08±0,08	0,65±0,66	0,09±0,31	8,27±12,70	0,14±0,15	0,94±1,18	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,17±0,10	0,01±0,02
	min	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,59	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	max	1,23	2,27	9,29	0,23	1,77	1,79	81,51	0,51	2,77	0,00	0,00	0,02	0,40	0,12
Kaymakaltı Sütü	X±Sx	0,02±0,04	0,13±0,17	0,52±0,79	0,02±0,03	0,12±0,15	0,02±0,11	2,37±2,22	0,04±0,05	0,17±0,27	0,04±0,08	0,00±0,00	0,00±0,00	0,13±0,07	0,01±0,03
	min	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00
	max	0,16	0,47	2,96	0,07	0,42	0,81	9,28	0,16	0,71	0,26	0,00	0,00	0,29	0,22

Kaymakta Ni 0,65 mg/kg ve kaymakaltı sütünde 0,12 mg/L olarak tespit edildi. Aslam ve ark. (2011), keçi ve sığır sütlerinde Ni değerlerini sırasıyla 20,402 mg/L ve 22,394 mg/L düzeylerinde çok yüksek miktarlarda saptamışlardır. Bunun sebebinin endüstriyel kirlenmeye bağlı olarak topraktaki Ni miktarının artması ve kullanılan sulara bulaşması sonucu olabileceğini ileri sürmektedirler. Bu çalışmanın aksine yapılan birçok çalışmada Ni değerlerinin düşük olduğu görüldü. Kılıçel ve ark. (2003), Van'da üretilen otlu lorlarda Ni değerini 0,11 mg/kg, Özlü ve ark. (2012), taze kaşarda 0,26 mg/kg, olgunlaşmış kaşarda 0,30 mg/kg, Soylu ve Temiz (2011), sığır sütlerinde ortalama Ni 0,49 mg/kg olarak bulmuştur. Yalçın ve Tekinşen (2010) ise beyaz salamura, tulum ve kaşar peynirlerde her birinden 30'ar örnek olmak üzere toplamda 90 örnek üzerinde çalışmış ve Ni değerlerini sırasıyla 0,49 mg/kg, 0,65 mg/kg ve 0,43 mg/kg olarak bulmuşlardır. Bulduğumuz değerler bu araştırmacılarla benzer sonuçlar taşımaktadır. Türk Gıda Kodeksi, Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkındaki Tebliğ'de (Türk Gıda Kodeksi, 2002) kaymak ve kaymak altı sütündeki Ni hakkında bir sınırlama bulunmamaktadır.

Yapılan çalışmada Cu değerleri incelendiğinde kaymakta 0,09 mg/kg olarak ve kaymak altı sütünde 0,02 mg/L olarak tespit edildi. Soylu ve Temiz (2011)'in yaptığı çalışmada Cu miktarı ortalama değerini 1,08 mg/kg olarak bulmuştur. Öksüztepe ve ark. (2013), çökelek ve kurut örneklerinde Cu miktarlarını çökelekte 1,13 mg/kg ve kurut örneklerinde 2,44 mg/kg olarak bulmuşlardır. Ankara'da yapılan bir çalışmada ise Cu miktarı sütte 4,30 mg/kg olarak saptanmıştır. Cu miktarındaki bölgesel farklılıkları sanayi ve otoyol yakınlığı ve bakırın mantarlara karşı kullanılmasından dolayı tarım ilaçlarından süte geçebileceğini şeklinde belirtmişlerdir (Temurci ve Güner, 2006). Yalçın ve Tekinşen (2010) Cu değerini beyaz salamura 1,44 mg/kg, tulum peynirinde 1,06 mg/kg, kaşar peynirinde 1,35 mg/kg olarak bulmuşlardır. Bulunan bu değerlerin peynir yapımında kullanılan ekipmanlardan, tarım ilaçlarında kullanılan Cu'nun hayvanın yediği yemlerden kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir.

Kaymakta Zn 8,27 mg/kg ve kaymakaltı sütünde 2,37 mg/L olarak tespit edildi. Kılıçel ve ark. (2003), otlu lorlardaki Zn ortalama değerini 29,9 mg/kg bulmuşlardır. Yalçın ve Tekinşen (2010) beyaz salamura ve tulum ve kaşar peynirlerinde Zn değerlerini sırasıyla 15,35 mg/kg, 15,96 mg/kg, 27,15 mg/kg olarak bulmuştur. Öksüztepe ve ark. (2013), Zn çökelekte 4,19 mg/kg ve kurut

örneklerinde de 9,66 mg/kg bulmuşlardır. Soylu ve Temiz (2011) ise Tekke ilçesi köylerinden elde edilen süt örneklerinde ortalama çinko miktarını 13,33 mg/kg bulmuşlardır. Enb ve ark. 2009 manda ve inek sütleri toplayarak süt ürünleri elde edip yaptıkları ağır metal analizinde sütte Zn değerini 4,350 mg/kg, yoğurtta 4,059 mg/kg, kremada 19,570 mg/kg ve tereyağında 29,363 mg/kg olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmalarda Zn değerleri yapılan çalışma ile uyumludur. Şanlı (2002), endüstriyel bölge atmosferinde bulunan çinkonun oldukça yüksek olabileceğini ve element halinde bulunan çinkonun zehirli olmadığını bildirmiştir. Zn'nun otomotiv, azotlu gübreler, cam, çimento, metal, petrol, plastik - sentetik madde, termik enerji ve çelik endüstrisi vb. geniş bir kullanım alanı vardır (Küçüköğlü, 1996). Sütteki kontaminasyon sütün sağıldığı kaplardan kaynaklanabileceği gibi çevresel kontaminasyondan da kaynaklanabilir.

Kaymakta As değeri 0,14 mg/kg ve kaymakaltı sütünde 0,04 mg/L olarak tespit edildi. İstanbulluoğlu ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada açıkta satılan sütte As'i ortalama olarak 0,5 mg/kg olarak bulmuşlardır. Açıkta satılan sütlerdeki As miktarının yüksek oluşunu hijyen koşullarına uyulmamasının bir sonucu olabileceğini bildirmişlerdir. Ayar ve ark. (2007), Konya'da süt ve süt ürünlerinin ağır metal kontaminasyonu üzerine yaptıkları çalışmada As'i 0,146 mg/kg olarak en yüksek tereyağında bulmuşlardır. Aslam ve ark. (2011), keçi ve sığır sütlerinde As değerlerini sırasıyla 0,403 mg/L ve 0,078 mg/L düzeylerinde saptamışlar. Türk Gıda Kodeksi (2002), gıdalarda As'in limitlerini 0,1 – 1 mg/kg olarak bildirmiştir. Araştırma sonucu incelendiğinde bulunan değerler bu sınırın içinde olduğu görülmektedir. As ile maruziyet volkanik patlamalar ve yeraltı suları gibi doğal nedenlerden olabileceği gibi ahşap koruma, pestisitler, yakıtların yakılması gibi antropojenik nedenlerden kaynaklanabilir (Güven ve ark., 2004).

Kaymakta Se 0,94 mg/kg ve kaymakaltı sütünde 0,17 mg/L olarak tespit edildi. İstabulluoğlu ve ark. (2012), çeşitli süt ve ürünlerinde yaptığı çalışmada Se değerini açıkta satılan kaşarda 0,5 mg/kg olarak bulmuştur ve Selenyumun çevreye yayılımının olası yollardan birini de insan ve hayvanlarda gıda takviyelerinin yoğun kullanımı olabileceğini söylemişlerdir. Ayar ve ark. (2007), çeşitli süt ve ürünlerinde bazı ağır metalleri incelemişler ve en yüksek Se değerini 0,434 mg/kg ile tulum peynirinde daha sonra en yüksek değeri 0,315 mg/kg ile tereyağında tespit etmiştir.

Mo diğer metallerin aksine kaymakta tespit edilmedi fakat kaymakaltı sütünde tespit edildi.

Kaymakaltı sütünde 0,04 mg/L olarak tespit edildi. Mo'in nispeten düşük toksisiteli olduğu ve bitkilere topraktan geçebileceği bildirilmiştir (İpek, 2003). Benincasa ve ark. (2008), manda sütünde Mo ortalama değerini 16,9 µg/kg ve inek sütünde 29,0 µg/kg olarak bulmuşlardır. Mo'in kaymakta görülmemesi sadece kaymakaltı sütünde görülmesi kaymağın Mo bağlamadığını düşündürmüştür.

Ba kaymakta 0,17 mg/kg ve kaymakaltı sütünde 0,13 mg/L olarak tespit edildi. Ba kullanım alanı oldukça geniş bir metaldir ve bu nedenle doğada sık olarak bulunabilmekte bitkiler vasıtasıyla hayvanlara geçebilmektedir. Yine ilaç kalıntılarıyla Ba sütte kontaminasyona neden olabilmektedir (Belitz ve ark., 2009). Tıp alanında kullanımı da çevreye yayılımının söz konusu olabileceğini düşündürmüştür (Şanlı, 2002). İstanbulluoğlu ve ark. (2012), yaptığı bir çalışmada sütte baryum içeriğini ambalajlı sütlerde 8,3 mg/kg olarak açıkta satılanlarda 1,7 mg/kg olarak bulmuştur. Benincasa ve ark. (2008), manda sütünde Ba miktarını 330 µg/kg ve inek sütünde 226 µg/kg olarak tespit etmişlerdir. Bulduğumuz değerler belirtilen değerlerden daha düşük olduğu görüldü.

Toplam kaymaktaki ve kaymakaltı sütündeki Pb miktarı 0,01 mg/kg ve 0,01 mg/L olarak tespit edildi. Soylu ve Temiz (2011) ortalama Pb değerini sütte 0,04 mg/kg olarak tespit etmişlerdir. Özlü ve ark. (2012) taze ve olgunlaşmış kaşar peynirlerde Pb miktarını sırasıyla 1,60 mg/kg ve 2,25 mg/kg olarak tespit etmişlerdir. Buldukları bu değerlerin süt üretiminin yapıldığı çiftlikler, peynir işletmeleri ile satış yerlerinin sanayi kuruluşlarına ve otoyollarına olan mesafesiyle ilişkili olabileceğinin kanısına varmışlardır. Özçetin ve ark. (2013) anne sütünde ağır metal analizi üzerine yaptıkları çalışmada Pb ortalama değerini 26, 71 µg/L olarak tespit etmişlerdir. Ayar ve ark. (2007) süt ve ürünlerinde ağır metal analizinde Pb miktarını süte göre peynir, yoğurt çeşitleri ve tereyağında daha yüksek bulmuşlardır. Sütte 0,10 mg/kg, tereyağında 0,11 mg/kg, süzme yoğurttta 0,13 mg/kg, kaşar peynirinde 1,10 mg/kg olarak tespit etmişlerdir. Peynirde Pb miktarının yüksek çıkmasını ise Pb'un kazein tarafından bağlanması nedeniyle olabileceğini bildirmişlerdir. Yalçın ve Tekinşen (2010) yaptıkları çalışmada ortalama Pb seviyesini beyaz salamura peynirlerinde 0,13 mg/kg, tulum peynirlerinde 0,08 mg/kg ve kaşar peynirlerinde 0,12 mg/kg olarak tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmada tüm örneklerin Pb bakımından çok düşük değerlere sahip olması nedeniyle bu ağır metal yönünden sağlık açısından herhangi bir tehdit oluşturmayacağı kanaati oluşmaktadır.

Toplam kaymak ile kaymakaltı sütleri karşılaştırıldığında ise Ag hiçbir kaymakta ve kaymakaltı sütünde tespit edilmedi. Mo kaymakta tespit edilmemişken kaymak altı sütünde tespit edildi. Diğer tüm ağır metaller yönünden bakıldığında kaymakta kaymakaltı süte göre yüksek olduğu görülmektedir. Yapılan çalışmalarda bazı ağır metallerin enzimlerin sülfhidril gruplarına etki edebileceğini ve fosfolipidlerin yapısında bulunabileceğini göstermektedir. Örneğin Cu metali yağ globül membranındaki proteinlerde sütteki diğer proteinlere göre daha yüksek bakır içerdiği gözlenmiştir (Yüzbaşı ve Sezgin 2002). Ayar ve ark. (2007), tarafından gerçekleştirilen süt ve süt ürünleri ağır metal düzeyleri üzerine yapılan bir çalışmada tereyağı ağır metal düzeyi diğer ürünlere oranla yüksek çıktığı görülmüştür. Çalışmamızdaki bulgular bu çalışmalarla uyumluluk göstermektedir. Enb ve ark. (2009) topladıkları inek ve manda sütlerinin ve sütlerden elde ettikleri ürünlerin ağır metal düzeylerini incelemişlerdir. Metal düzeyleri incelendiğinde genel olarak süt ve yoğurda göre krema ve tereyağı gibi yağlı ürünlerin metal düzeylerinin daha yüksek olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak; kaymak ve kaymakaltı sütleri ağır metal düzeyleri yönünden karşılaştırıldığında kaymak numunelerindeki ağır metal seviyelerinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Ağır metal miktarlarına genel olarak bakıldığında Türk Gıda Kodeksi'nde verilen sınırlar içinde yer almaktadır. Ayrıca, bulunan değerler bakımından kaymak ve kaymakaltı sütü örneklerinin sağlık yönünden herhangi bir tehlike arz etmediği söylenebilir. Kaymakta Mn, Fe, Co, Zn, Se gibi esansiyel iz elementlerinin kaymakaltı süte göre daha yüksek bulunması kaymağın besleyici değerinin fazla olduğunu göstermiştir.

KAYNAKÇA

- Adam RC.** Süt III. Çeşitli Ürünler ve Artıkları. E.Ü.Z.F. Yayınları, İzmir. 1971; No: 170.
- Akalin AS, Gönç S, Ünal G, Ökten S.** Determination of Some Chemical and Microbiological Characteristics of Kaymak. Grasas Y Aceites. 2006; 57 (4): 429-432.
- Aslam B, Javed I, Khan FH.** "Uptake of heavy metal residues from sewerage sludge in the milk of goat and cattle during summer season." Pakistan Veterinary Journal. 2011; 31 (1): 75-77.
- Ayar A, Sert D, Akın N.** Konya'da Tüketime Sunulan Süt ve Süt Ürünlerinin Ağır Metal İçeriklerinin Belirlenmesi. Selçuk

- Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi. 2007; 21 (41): 58 – 64.
- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P.** Milk and Dairy Products. Food Chemistry. 4th ed. München: Springer. 2009; P. 523.
- Benncasa C, Levis J, Sindona G, Tagarelli A.** The Use of Multi Element Profiling to Differentiate Between Cow and Buffalo Milk. Food Chemistry. 2008; 110: 257 – 262.
- Çon AH, Gökçe R, Gürsoy O.** Farklı Şekillerde Ambalajlanan Afyon Kaymaklarının Muhafaza Sürelerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. VI Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu., Tekirdağ. S. 2000; 557 – 566.
- Enb A, Abou Donia MA, Abd-Rabou NS, Abou-Arab AAK, El-Senaity MH.** Chemical Composition of Raw Milk and Heavy Metals Behavior During Processing of Milk Products. Global Veterinaria. 2009; 3 (3): 268 – 275.
- Goyer RA.** Toxic effects of metals. In: Caserett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons (Eds. Amdur M. O., Doull, J., Klaassen, C. D.) Pergamon Press, New York. 1991; 1032.
- Güven A, Kahvecioğlu Ö, Kartal G, Timur S.** Metallerin Çevresel Etkileri-III. TMMOB Metalurji Mühendisleri Odası. Metalurji Dergisi. 2004; 138: 64-71.
- İpek H.** Molibden, YYÜ. Vet. Fak. Derg. 2003; 14(1): 73-76.
- İstanbuluoğlu H, Oğur R, Tekbaş FÖ, Bakır B.** Süt ve Süt Ürünlerinde Ağır Metal Kirliliği. Türkiye Klinikleri J. Med. Sci. 2013; 33 (2): 410 – 419.
- Kahvecioğlu Ö, Kartal G, Güven A, Timur S.** Metallerin Çevresel Etkileri-I. Metalurji Dergisi. 2003; 136: 47 – 53.
- Kılıçel F, Tarakçı Z, Sancak H, Durmaz H.** Otluların Mineral Madde ve Ağır Metal İçerikleri. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi. Tarım Bilimleri Dergisi. 2004; 14(1): 41- 45.
- Kurt A, Özdemir S.** Erzurum'da Yapılıp Satılan Kaymakların Bileşimi ve Mikrobiyolojik Kalitesi. Gıda, 1988; 13: 205 – 208.
- Küçüköğlü M.** Zebra Balığının (Brachydanio rerio) Embriyolojik Gelişimi Üzerine Kadmiyum Klorür ve Çinko Klorür gibi Çevre Kirleticilerinin Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi. Adana. 1996.
- Öksüztepe G, İncili KG, Uysal AI.** Elazığ'da Satılan Çökelek ve Kurutların Mineral Madde ve Ağır Metal Düzeyleri. E – Journal New World Science Academy. 2013; 8 (3): 1 – 9.
- Özçetin M, Yılmaz R, Mendil D, Koçyiğit R, Çedik Kulak D.** Presence of Toxic Heavy Metals in Human Breast Milk. Journal of Clinical and Analytical Medicine, 2013; 4 (2): 89 – 92.
- Özlu H, Atasever AM, Urçar S, Atasever M.** Erzurum'da Tüketime Sunulan Kaşar Peynirlerinin Mineral Madde İçeriği ve Ağır Metal Kontaminasyonu. Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg., 2012; 18 (2): 205 – 208.
- Soylu A, Temiz H.** (2011). Samsun'da Sanayi Emisyonlarının Yöre Sığır Sütlerinin Ağır Metal İçeriğine Etkisi. Samsun Sempozyumu.
- Şanlı Y.** Veteriner Klinik Toksikoloji, Güngör Matbaacılık, Ankara. 2002.
- Tekinşen C.** "Süt Ürünleri Teknolojisi", Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya. 2000.
- Temurci H, Güner A.** "Ankara'da Tüketime Sunulan Süt ve Beyaz Peynirlerde Ağır Metal Kontaminasyonu." Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi. 2006; 1.2.
- TGK,** Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Ankara, 2002. (Erişim Tarihi: 25.02.2015)
- Yalçın Ö, Tekinşen KK.** Konya'da Tüketime Sunulan Salamura, Tulum ve Kaşar Peynirlerinin Ağır Metal İçeriklerinin Araştırılması. Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg. 2010; 21: 5 – 10.
- Yüzbaşı N, Sezgin E.** Süt Ve Ürünlerindeki Metalik Kontaminantların Toksikolojik Etkileri, Gıda. 2002; 27 (2): 121-127.
- Zheljzakov VD, Nielsen NE.** Effect of Heavy Metals on Peppermint and Commint. Plant and Soil. 1996; 178 (1): 59-66.

Expression Profile of Intraovarian Genes in Ovary Tissues at Follicular and Luteal Phases in Holstein Cattle[#]

Selçuk ÖZDEMİR^{1*}, Selim ÇOMAKLI², Harun ARSLAN³

¹Department of Genetics, Faculty of Veterinary Medicine, Atatürk University, Yakutiye, 25240, Erzurum, Turkey

²Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Atatürk University, Yakutiye, 25240, Erzurum, Turkey

³Department of Basic Sciences, Faculty of Fisheries, Atatürk University, Yakutiye, 25240, Erzurum, Turkey

[#]We thanks to Eastern Anatolia Advanced Technology Application and Research Center (DAYTAM) of Atatürk University for supporting. Funds for this work were provided by Atatürk University Scientific Research Projects SRP-2016/84. The molecular part of this study was presented in 2nd International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies (ICAFOT) 2-5 April, 2018 Çeşme-İzmir/Turkey. All experiments were performed in accordance with relevant guidelines required by Atatürk University, Turkey. All experimental protocols were approved by Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Turkey (2018/30).

*Corresponding author e-mail: selcuk.ozdemir@atauni.edu.tr

ABSTRACT

The aim of the present study is to determine comparatively expression levels of the *BMP15*, *TGFB1*, *TGFB2* and *GDF9* genes in the preovulatory follicle and corpus luteum tissue of Holstein cattle. For this purpose, primarily the tissues were examined by immunohistochemical staining. Later on, follicular fluid was analyzed by ELISA test and estradiol and progesterone levels were determined. Finally, expression levels of the related genes were determined between the groups by qRT-PCR. Immunohistochemical staining revealed that estrogen receptor alpha and progesterone receptor immunoreactivities were intensely present in preovulatory follicles, estrogen alpha receptor immunoreactivity was very slight and progesterone receptors were similar to positivity in preovulatory follicles in corpus luteum. Furthermore, estradiol level was high in preovulatory follicles and progesterone level was high in corpus luteum. The levels of mRNA transcripts of the *TGFB1* and *TGFB2* genes in the preovulatory follicles were statistically higher than the corpus luteum ($p<0.01$, $p<0.05$, respectively), but there was no statistically significant difference between the groups in the mRNA transcript levels of the *BMP15* and *GDF9* genes ($p>0.05$). As a result, it is thought that differential expression of intraovarian genes may be associated with differences in follicular dynamics and gene expression levels within the cell population of ovarian tissue, so this situation may result in follicular and luteal phase.

Key Words: Corpus luteum, holstein, intraovarian genes, preovulatory follicle, qRT-PCR.

Holştayn Sığırlarında Foliküler ve Luteal Fazdaki Ovaryum Dokularında İntraovarian Genlerin Ekspresyon Profili

ÖZ

Bu çalışmanın amacı, Holştayn sığırlarına ait preovülatör folikül ve korpus luteum dokularında *BMP15*, *TGFB1*, *TGFB2* ve *GDF9* genlerinin ekspresyon seviyelerini karşılaştırılmalı olarak belirlemektir. Bu amaç için, öncelikle dokular immunohistokimyasal boyama ile incelendi. Daha sonra foliküler sıvılar ELISA testiyle incelenerek östradiol ve progesteron seviyeleri belirlendi. Son olarak qRT-PCR ile gruplar arasında ilgili genlere ait ekspresyon seviyeleri tespit edildi. Immunohistokimyasal boyama sonucunda preovülatör foliküllerde yoğun miktarda östrojen reseptör alfa ve progesteron reseptör immunpozitifliklerine, korpus luteum da çok hafif düzeyde östrojen alfa reseptör immunpozitifliğine, progesteron reseptörlerinin ise preovülatör foliküllerdeki pozitiflik düzeyine yakın olduğu belirlendi. Östradiol seviyesi, preovülatör foliküllerde yüksek, progesteron seviyesi ise korpus luteumda yüksek olarak bulundu. Preovülatör foliküllerdeki *TGFB1* ve *TGFB2* genlerine ait mRNA transkript seviyesi korpus luteuma göre istatistiksel olarak daha yüksek bulundu ($p<0.01$, $p<0.05$, sırasıyla), ancak gruplar arasında *BMP15* ve *GDF9* genlerine ait mRNA transkript seviyesinde istatistiksel olarak bir fark gözlenmedi ($p>0.05$). Sonuç olarak intraovarian genlerin farklı ekspresyonunun, ovaryum dokusunu oluşturan hücre popülasyonu içinde folikül dinamikleri ve gen ekspresyon seviyelerinin farklılıklarıyla ilişkili olabileceğini ve bu durumun da foliküler ve luteal dönemin sonucu olarak ortaya çıkabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Korpus luteum, holştayn, , intraovarian genler, preovülatör folikül, qRT-PCR.

To cite this article: Özdemir S. Çomaklı S. Arslan H. Expression Profile of Intraovarian Genes in Ovary Tissues at Follicular and Luteal Phases in Holstein Cattle. Kocatepe Vet.J. (2018) 11(4): 454-462.

INTRODUCTION

Ovary activity and hormones are very important in terms of pubertal development and normal reproductive performance (Bliss et al. 2010). Enhancement of reproductive performance in cattle breeding, has great significance due to its effect on farm productivity as well as an effective herd management and profitable production from the industrial aspect (Ball and Peters 2004, Burrow 2012). The periodic growth in cattle ovaries is regulated through FSH which is the hormone stimulating follicle (Donadeu and Pedersen 2008). Follicle phase is the first phase of growth in the ovarium. In the follicular phase, the largest follicle continues to grow while the other small follicles suffer atresia. The follicle continuing to grow can be converted to corpus luteum subsequent to ovulation. There are millions of genes responsible for the developmental phases of ovaries in cattle. Numerous genes have been identified at the transformation from luteal phase to follicle selection, maturation, and follicle phases as a result of transcriptome analyses (Rao et al. 2008). Determination of gene expressions engaged in the development of follicles as well as interactions between these genes may produce practical results in the context of animal breeding. Estrogen is an important steroid hormone which regulates steroidogenesis and folliculogenesis (Merk et al. 1972, Drummond and Findlay 1999). There are two important estrogen receptors as estrogen receptor alpha (ER-a) and estrogen receptor beta (ER-b). The foregoing receptors exist in follicles, interstitial tissue, germinal epithelium during different phases of development (Huias-Stasiak and Gawron 2007, Panoulis et al. 2015). Progesterone has an important role in the regulation of the reproductive cycle. Progesterone binds to intracellular progesterone receptors in target tissues and becomes active subsequently (Delman and Eurell 1988). Progesterone also has two forms as A and B like estrogen receptors (Graham and Clarke 1997, Wolfer et al. 2016).

Regulation of ovarian activity is a complex process comprising FSH and LH receptors, ovarian steroids as well as intra-variant factors (Van den Hurk and Zhao 2005). The most important in intraovarian factors include bone morphogenetic proteins (*BMPs*) 6, 7 and 15 (*BMP6*, *BMP7* and *BMP15*), ovarian somatic cells and transforming growth factor-beta (*TGFB*) expressed specifically by oocytes during the folliculogenesis phase (*TGFB1* and *TGFB2*) are members of the superfamily (Knight and Glister 2006, Otsuka 2010). The cited genes regulate

ovarian follicular development at the molecular level in addition to affecting fertility (Corduk et al. 2012, Nagashima et al. 2011, Paradis et al. 2009). Furthermore, the growth differentiation factor 9 (*GDF9*) gene expression is important for both humans and animals as regards oocyte competence and fertility (Barros et al. 2012).

There is not sufficient information with respect to *BMP15*, *TGFB1*, *TGFB2*, and *GDF9* gene expressions in ovaries at follicular, and luteal phases of Holstein breed. The objective of this study is to determine *BMP15*, *TGFB1*, *TGFB2* and *GDF9* gene expressions in ovaries at follicles and luteal phases. The different expression levels of these genes will furnish useful information as regard the determination of the role of these genes in follicular development as well as their molecular mechanisms.

MATERIAL and METHOD

Material

The animal material utilized in the study comprised 20 specimens of ovaries from Holstein cattle following the slaughter thereof. Totally 20 Holstein cows (n=20), around 5 years old, were selected to obtain the ovary tissue samples. The selection criteria of cows are multiparous, lactating (late lactation stage), and body condition score of 3.0 to ≤ 3.50 . The ovaries collected following the slaughter carried out at Oral Meat Integrated Facilities in Erzurum province were sterilized by 70% ethanol. The preovulatory follicle (POF) and corpus luteum (CL) tissue samples were measured by virtue of Vernier caliper. The samples of received POF were about 11.18 ± 1.8 mm while received CL samples were about 14.32 ± 1.57 mm. Subsequently, tissue samples were then quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C.

Method

Immunohistochemical staining

The tissues fixed in neutral formaldehyde solution during 1 day were washed with tap water. The tissues were placed in paraffin blocks after the alcohol-xylol follow-up process. After the deparaffinization of the tissues placed on the polylysine-coated slides was conducted, the cells were incubated in 3% H_2O_2 for 10 minutes to inactivate endogenous peroxidase activity and washed in PBS. Subsequently, they were kept in the antigen retrieval solution for 10 min at 500W in order to remove the antigens in the tissues and then washed in PBS. Protein block solution was added with a view to preventing nonspecific bindings and then they were washed in

PBS. Progesterone R / NR3C3 Antibody (Alpha PR6) (NB120-2765) and Estrogen Receptor alpha Polyclonal Antibody (PA5-16476) antibodies were applied as primer antibody at 1/100 dilution ratios to the sections washed with PBS. Subsequently, the procedure indicated in Expose mouse and rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit (Abcam: ab80436) was followed. 3,3'-diaminobenzidine chromogen was employed and stained with hematoxylin as contrast. Positive cells were examined by virtue of a light microscope at 20x magnification.

ELISA Test

Estradiol and progesterone concentrations in follicular fluid were measured to determine progesterone and estrogen active follicles. 7 β -Estradiol high sensitivity ELISA kit (Enzo Life Sciences, UK) was used for estradiol while Progesterone Competitive ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) kit was used for progesterone. Concentration measurement was performed according to the procedure given in the ELISA kits. (Standard curve, 15.6-1,000 pg / ml E2 and 50 pg / mL-3,200 pg / mL progesterone). In addition, we calculated the recovery of ELISA results (Table 1 and Table 2).

Total RNA Isolation

Total RNA isolation was realized from the collected tissue samples through the utilization of Trizol (Invitrogen, USA). Total RNA isolation was realized in line with the kit's procedure. Following the total RNA isolation, the RNA concentration was measured by virtue of NanoDrop (Epoch Microplate Spectrophotometer, USA). RNAs were run in a 1.5% agarose gel in 1XTBE solution for one hour at 80 volts with a view to control total RNA quality and visualized by gel imaging system (Bio-Rad Gel Doc XR⁺) and their RNA quality was determined (Fig. S1).

DNase I treatment and cDNA Synthesis

DNase I (Thermo Scientific, USA) was employed against DNA contamination in isolated RNA samples. Dnaz I treatment was performed in line with the protocol provided in the kit. Subsequently, 1 μ g was taken from these RNAs and cDNA was synthesized through utilization of the miScript Reverse Transcription Kit (Qiagen, Germany) in line with the protocol provided. The purity and quantity of the obtained cDNAs were measured by virtue of spectrophotometer (Epoch Microplate Spectrophotometer, USA), and the cDNAs were diluted at the same ratios. Subsequently, the cDNA samples were stored at -20 $^{\circ}$ C for utilization in Real Time PCR studies.

Real time PCR

qRT-PCR was performed through utilization of the CFX96 BioRad device in order to measure the mRNA transcript levels of the *BMP15*, *TGFB1*, *TGFB2* and *GDF9* genes. The GAPDH gene was employed for internal control. Master mix content created in real time PCR experiments is as follows: Syber Green 2X Rox Dye Master mix (Qiagen Germany), forward and reverse primers designed for genes, cDNAs as template and nuclease-free water. The samples were analyzed in Real Time device following the preparation of master mixes and the obtained Ct values were calculated according to $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method and expression levels of the respective genes were determined (Livak and Schmittgen 2001). Reaction conditions and primer sequences of the genes are shown in Table 3. The primer sequences were received from a previously conducted study (Weller et al. 2016).

Statistical analysis

IBM SPSS 20 program was employed for statistical analysis. Statistical differences of mRNA transcript levels of *BMP15*, *TGFB1*, *TGFB2* and *GDF9* genes were analyzed through utilization of t-test method while statistical differences of Estradiol and progesterone concentration (pg/ml) was determined through utilization of one-way analysis of variance (ANOVA). Relative mRNA expression graphics and estradiol and progesterone concentration graphics were generated by using Graph pad prism software Inc., (Version 7.0, California, USA). qRT-PCR results were expressed as mean \pm SEM (standard error of the mean). For statistical comparisons, probability levels of $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ were accepted as statistically significant.

RESULTS

Immunohistochemical Examination

As a result of the immunohistochemical staining, intense amounts of estrogen receptor alpha (Fig. 1A) and progesterone receptor immunopositivity (Fig. 1B) were observed in the ovaries thought to be at follicular phases. Estrogen receptor alpha and progesterone receptor immunopositives at the follicular phase were observed in the theca interna (arrow) and theca externa (arrowhead) cells. Estrogen alpha receptor was found to be at very mild level at the luteal phase in the lutein cells (arrow) due to the decrease in immunopositivity (Fig.1C) In progesterone receptors, it was determined to have the close positivity level in the lutein cells' (arrow) follicular phase (Fig. 1D).

Estradiol and Progesterone Levels in POF and CL

ELISA test was applied to the collected preovulatory follicles and corpus luteums and they were analyzed in terms of estradiol and progesterone. Estradiol levels were higher in ≥ 10 mm preovulatory follicles (predominantly sized follicles classified as healthy) as expected, (Fig. 2A). Progesterone levels were relatively high in the corpus luteum (Fig. 2B).

Transcriptional Analysis

Expression levels of *BMP15*, *TGFB1*, *TGFB2* and *GDF9* genes in POF and CL were measured by virtue of qRT-PCR. mRNA transcript levels of *TGFB1* and *TGFB2* genes in POF were found statistically higher compared to CL (Figs. 3A and 3B) ($p < 0.01$, $p < 0.05$, respectively), but no statistically significant difference was observed in mRNA transcript level of *BMP15* and *GDF9* genes between groups (Figs. 4A and 4B) ($p > 0.05$).

Table 1. Recovery rate for estradiol

Low Samples %	High Samples %	Expected Conc. (pg/ml)	Observed Conc. (pg/ml)	% Recovery
80	20	457.3	504.7	111.9
60	40	655.5	717.2	108.2
40	60	1035.4	1082.8	104.5
20	80	1288.9	1345.1	103.5
			Mean recovery	108.5%

Table 2. Recovery rate for progesterone

Low Samples %	High Samples %	Expected Conc. (pg/ml)	Observed Conc. (pg/ml)	% Recovery
80	20	651.2	699.3	105.1
60	40	962.1	1024.4	104.3
40	60	1253.8	1324.8	103.9
20	80	1551.7	1602.7	102.2
			Mean recovery	105.4%

Table 3. Primer sequences of *GAPDH*, *TGFB1*, *TGFB2*, *BMP15* ve *GDF9* genes

Primer	Sequences (5'-3')	Annealin g °C	Base Pair	Accession Number	Reaction Conditions
GAPDH	F: GATGCTGGTGCTGAGTATGT R: GCAGAAGGTGCAGAGATGAT	58	113	NM_001034034.2	94°C 15 s / 58°C 30 s / 72°C 30 s (40 cycles)
TGFB1	F: TGCTTCAGCTCCACAGAAA R: GTATCCAGGCTCCAGATGTAAG	58	149	NM_001166068.1	94°C 15 s / 58°C 30 s / 72°C 30 s (40 cycles)
TGFB2	F: CACGAATGGCTCCACCATAA R: AGCGTGCTTCTAGTTCCTCAC	58	127	NM_001113252.1	94°C 15 s / 58°C 30 s / 72°C 30 s (40 cycles)
BMP15	F: GTAGTGAGGTTTCGTGAGTTCTG R: TAGGGAGAGGTTTGGTCTTCT	58	111	NM_001031752.1	94°C 15 s / 58°C 30 s / 72°C 30 s (40 cycles)
GDF9	F: GCATTCCTCCACCCTAAA R: GGTGACGGGACAATCTTACA	58	113	NM_174681.2	94°C 15 s / 58°C 30 s / 72°C 30 s (40 cycles)

*Reference gene (internal control).

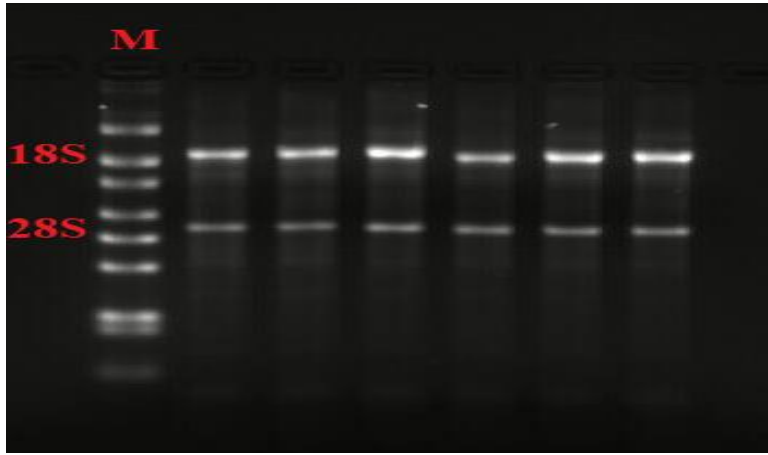


Figure S1. Gel image of isolated total RNA samples (18S/28S RNA)

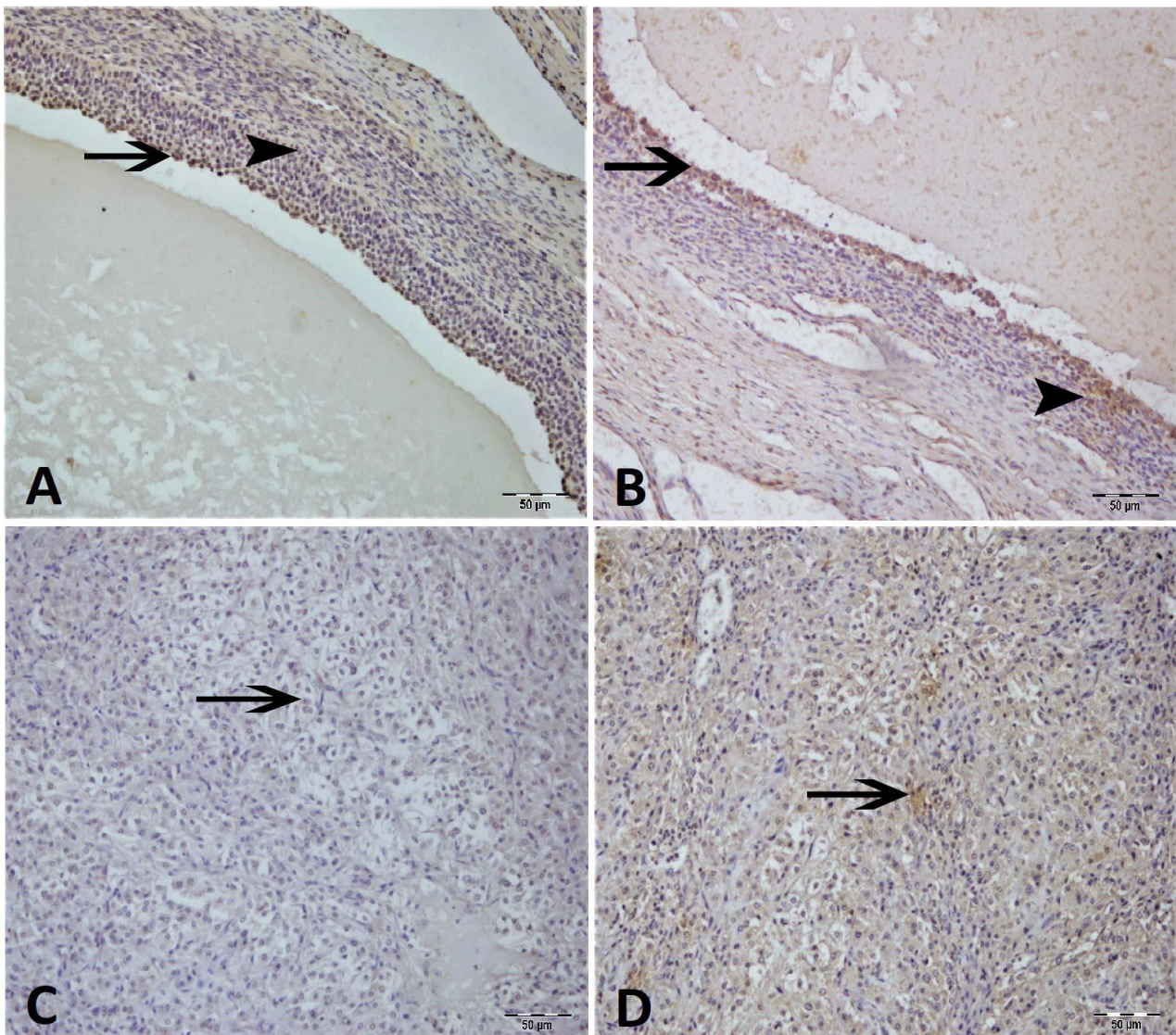


Figure 1. A) Follicular stage; intense estrogen receptor alpha immunopositivity in Teka externa (arrowhead) and teka interna (arrow) cells. B) Follicular stage; Immunopositivity of progesterone receptors in Teka externa (arrow head) and teka interna (arrow) cells. C) Luteal stage; estrogen receptor alpha immunopositivity at very mild level in lutein cells (arrow). D) Luteal stage; progesterone receptor immunopositivity in lutein cells (arrow)

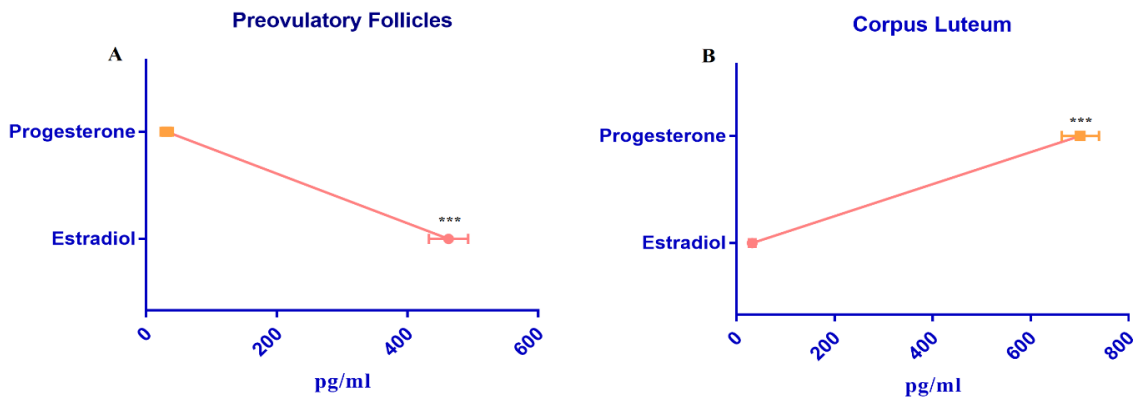


Figure 2. Estradiol / Progesterone levels in the preovulatory follicle and corpus luteum (pg/ml)

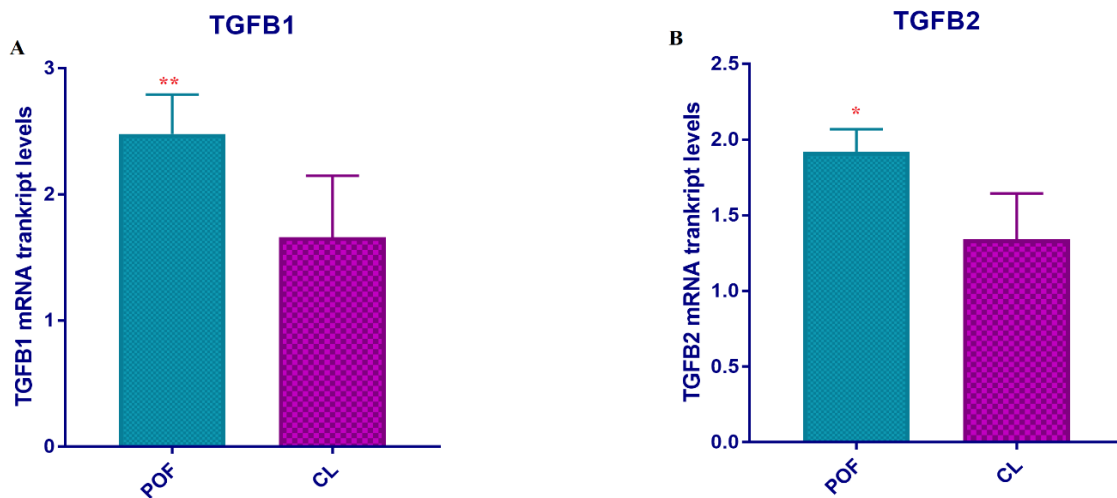


Figure 3. mRNA transcript levels of the *TGFB1* and *TGFB2* genes in the preovulatory follicle and corpus luteum tissues. Values represent the mean \pm SD of 3 independent samples; The error bars show the standard deviation. Statistical significance (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) was analyzed by One Way ANOVA. A) Represent the relative mRNA expression levels of the *TGFB1* gene. B) Represent the relative mRNA expression levels of the *TGFB2* gene

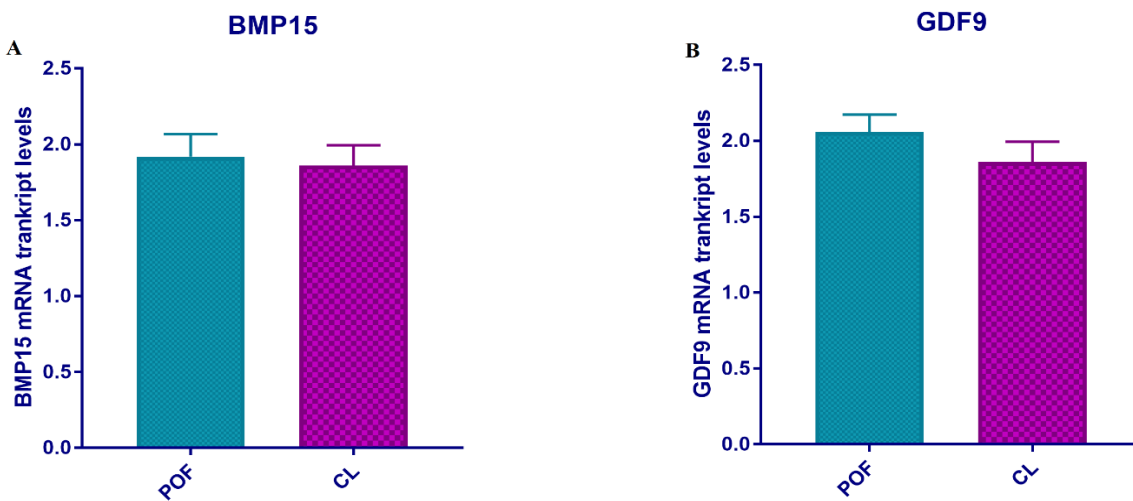


Figure 4. mRNA transcript levels of the *BMP15* and *GDF9* genes in the preovulatory follicle and corpus luteum tissues. Values represent the mean \pm SD of 3 independent samples; The error bars show the standard deviation. Statistical significance was analyzed by One Way ANOVA. A) Represent the relative mRNA expression levels of the *BMP15* gene. B) Represent the relative mRNA expression levels of the *GDF9* gene

DISCUSSION

This study reveals different expression levels of the *BMP15*, *TGFB1*, *TGFB2* and *GDF9* genes in the preovulatory follicle and corpus luteum. FSH, LH, ovarian steroids and intra-ovarian factors have a role in regulation of ovarian activity (Van den Hurk and Zhao 2005). The genes of the TGFB superfamily, such as *GDF9*, *BMP15*, *TGFB1* and *TGFB2*, and the cell receptors thereof are known to be paracrine and autocrine modulators of ovarian functions and fertility (Knight and Glistler 2006, Otsuka 2010, Corduk et al. 2012, Nagashima et al. 2011, Paradis et al. 2009). The findings we have obtained from this study is in compliance with current theories.

Berisha (2002) have examined the expression of estrogen and progesterone receptors in the ovaries of cattle during the estrous cycle period in a study conducted thereby. In this study, they have observed the fact that ERalpha receptors increased in granular cells during the follicular development in theca interna cells towards the end of the follicular phase. They have reported that the ERalpha receptors became at the highest level at the onset of the luteal phase, but decreased towards the middle and the end of the period. It was observed that there was no significant change in progesterone receptivity during the estrous cycle in the same study. Estrogen alpha and progesterone receptors were observed intensely in ovaries at the follicular phase in the present study. In ovaries at the luteal phase, estrogen receptor alpha levels decreased and progesterone receptor levels were found to be at the same level. The decrease in estrogen receptors at the luteal phase suggests that the cycle is at the middle or late phase of the luteal phase. As a result, it was observed that both receptors were intensified at the follicular phase, and estrogen receptor alpha decreased and progesterone receptor levels were at the same level at the middle or late periods of the luteal phase.

BMPs have an important role in the regulation of follicle development, ovulation, and KL morphogenesis (Otsuka et al. 2011, Shimasaki et al. 2004). Weller (2016) revealed that there was no change in the expression levels of *BMP15* and *GDF9* genes in follicular and luteal ovarian tissues of *Bos indicus* cattle. Similarly, there was no statistical difference in the gene expressions of *BMP15* and *GDF9* in POF and KL in this study. This result shows that the *BMP15* and *GDF9* genes are expressed without change in follicle development (in POF and KL processes) in mammals. This suggests that *BMP15* and *GDF9*

genes actively have a role in molecular mechanisms with both follicular and luteal development.

Transforming growth factor-beta isoforms (*TGFB1* and *TGFB2*) are known as multifunctional regulatory molecules because they stimulate and inhibit proliferation, differentiation, and other critical cell functions according to type of ovarian cells, stage and other growth factors (Lee et al. 2001, Hanukoglu 1992, Juengel and McNatty 2005). *TGFB1* in cattle and *TGFB1* and *TGFB2* in sheep have an inhibitory effect on the proliferation of granulosa cells (Saragueta et al. 2002, Gilchrist et al. 2003). *TGFB1* mRNA and protein expression in cattle granulosa cells decreases during the progression of folliculogenesis (Juengel et al. 2004, Matiller et al. 2014, Farberov and Meidan 2016). Furthermore, in cattle, *TGFB1* is expressed in granulosa cells in the earliest phases of development (early preantral and early antral follicle) while it is expressed less in larger follicles (Oullette et al. 2005). In this study, we showed that *TGFB1* and *TGFB2* genes are expressed more in preovulatory follicles. This situation suggests us that inhibition of proliferation induced by *TGFB1* may make the cell more susceptible to FSH and causes differentiation of the granulosa cells. Moreover, this result is also consistent with previous studies (Oullette et al. 2005, Saragueta et al. 2002, Gilchrist et al. 2003, Farberov and Meidan 2016).

CONCLUSION

Briefly, our results suggest that differential expression of intraovarian genes may be related to differences in follicular dynamics and gene expression levels within the cell population which form the ovarian tissue. This result could occur as a result of the follicular and luteal phases. The determination of expression levels of the genes in the preovulatory follicle and the corpus luteum in cattle in a comparative way will furnish a source for studies to be conducted in order to determine the molecular mechanisms of these genes.

REFERENCES

- Ball PJH, Peters AR.** Reproduction in Cattle. Third Edition, 242 p, Blackwell Publishing, Ltd, 2004; 9600 Garsington Road, Oxford OX4 2DQ, UK.
- Barros CM, Satrapa RA, Castilho AC, Fontes PK, Razza EM, Ereno RL.** Effect of superstimulatory treatments on the expression of genes related to ovulatory capacity, oocyte competence and embryo

- development in cattle. *Reprod Fertil Dev.* 2012; 25: 17–25.
- Berisha B, Pfaffl MW, Schams D.** Expression of Estrogen and Progesterone Receptors in the Bovine Ovary During Estrous Cycle and Pregnancy. *Endocrine.* 2002; 17(3): 207–214.
- Bliss SP, Navratil AM, Xie J, Roberson MS.** GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. *Front Neuroendocrinol.* 2010; 31(3): 322–340.
- Burrow HM.** Importance of adaptation and genotype x environment interactions in tropical beef breeding systems. *Animal.* 2012; 6(5): 729–740.
- Corduk N, Abban G, Yildirim B, Sarioglu-Buke A.** The effect of vitamin D on expression of TGF beta1 in ovary. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2012; 120(8): 490–503.
- Delman HD, Eurell JA.** Textbook of Veterinary Histology. 5th ed., 252- 325, 1988; Williams-Wilkins, London.
- Donadeu FX, Pedersen HG.** Follicle development in mares. *Reproduction in Domestic Animals.* 2008; 43: 224–231.
- Drummond AE, Findlay JK.** The role of estrogen in folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 1999; 151: 57-64.
- Farberov S, Meidan R.** Thrombospondin-1 Affects Bovine Luteal Function via Transforming Growth Factor-Beta1-Dependent and Independent Actions. *Biol Reprod.* 2016; 94(1): 25.
- Gilchrist RB, Morrissey MP, Ritter LJ, Armstrong DT.** Comparison of oocyte factors and transforming growth factor-b in the regulation of DNA synthesis in bovine granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2003; 201(1–2): 87–95.
- Graham JD, Clarke CL.** Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev.* 1997; 18: 502-519.
- Hanukoglu I.** Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem.* 1992; 43(8): 779–804.
- Huias-Stasiak M, Gawron A.** Immunohistochemical localization of estrogen receptors ER alpha and ER beta in the spiny mouse (*Acomyscahirinus*) ovary during postnatal development. *J Mol Hist.* 2007; 38: 25-32.
- Juengel JL, Bibby AH, Reader KL, Lun S, Quirke LD, Haydon LJ.** The role of transforming growth factor-b (TGF-b) during ovarian follicular development in sheep. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004; 2: 78–88.
- Juengel JL, McNatty KP.** The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum Reprod Update.* 2005; 11(2): 143–60.
- Knight PG, Glister C.** TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction.* 2006; 132(2): 191–206.
- Lee WS, Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S.** Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biol Reprod.* 2001; 65(4): 994–9.
- Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and The 2^{-Delta Delta} C(T) Method. *Methods.* 2001; 25: 402–408.
- Matiller V, Stangaferro ML, Díaz PU, Ortega HH, Rey F, Huber E, Salvetti NR.** Altered expression of transforming growth factor-beta isoforms in bovine cystic ovarian disease. *Reprod Domest Anim.* 2014; 49(5): 813-23.
- Merk FB, Botticelli CHR, Albright JT.** An intercellular response to estrogen by granulosa cells in rat ovary: An electron microscope study. *Endocrinology.* 1972; 90: 992-1007.
- Nagashima T, Kim J, Li Q, Lydon JP, DeMayo FJ, Lyons KM.** Connective tissue growth factor is required for normal follicle development and ovulation. *Mol Endocrinol.* 2011; 25(10): 740–59.
- Otsuka F.** Multiple endocrine regulation by bone morphogenetic protein system. *Endocr J.* 2010; 57(1): 3–14.
- Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S.** Biological function and cellular mechanism of bone morphogenetic protein-6 in the ovary. *J Biol Chem.* 2001; 276(35) :32889–95.
- Oullette Y, Price CA, Carrière PD.** Follicular fluid concentration of transforming growth factor-beta1 is negatively correlated with estradiol and follicle size at the early stage of development of the first-wave cohort of bovine ovarian follicles. *Domest Anim Endocrinol.* 2005; 29(4); 623–33.

- Panoulis K, Christantoni E, Pliatsika P, Anagnostis P, Goulis DG, Kondi-Pafiti A, Armeni E, Augoulea A, Triantafyllou N, Creatsa M, Lambrinouadaki I.** Expression of gonadal steroid receptors in the ovaries of post-menopausal women with malignant or benign endometrial pathology: A pilot study. *Gynecol Endocrinol.* 2015; 31: 613-617.
- Paradis F, Novak S, Murdoch GK, Dyck MK, Dixon WT, Foxcroft GR.** Temporal regulation of BMP2, BMP6, *BMP15*, *GDF9*, BMPR1A, BMPR1B, BMPR2 and TGFBR1 mRNA expression in the oocyte, granulosa and theca cells of developing preovulatory follicles in the pig. *Reproduction.* 2009; 138(1): 115–29.
- Rao JU, Shah KB, Puttaiah J, Rudraiah M.** Gene expression profiling of preovulatory follicle in the buffalo cow: effects of increased IGF-I concentration on periovulatory events. *PLoS ONE.* 2011; 6 e20754.
- Saragueta PE, Lanuza GM, Baranao JL.** Autocrine role of transforming growth factor b1 on rat granulosa cell proliferation. *Biol Reprod.* 2002; 66(6): 1862–8.
- Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF.** The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev.* 2004; 25(1): 72–101.
- Van den Hurk R, Zhao J.** Formation of ovarian follicles and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology.* 2005; 63(6): 1717–1751.
- Weller MM, Fortes MR, Porto-Neto LR, Kelly M, Venus B, Kidd L, do Rego JP, Edwards S, Boe-Hansen GB, Piper E, Lehnert SA, Guimarães SE, Moore SS.** Candidate Gene Expression in *Bos indicus* Ovarian Tissues: Prepubertal and Postpubertal Heifers in Diestrus. *Front Vet Sci.* 2016; 18: 3-94.
- Wolfler MM, Kiippers M, Rath W, Buck VU, Meinhold-Heerlein I, Classen-Linke I.** 2016. Altered expression of progesterone receptor isoforms A and B in human eutopic endometrium in endometriosis patients. *Ann Anat.* 2016; 206: 1-6.

Use of Vitamin C for Premedication Prior to Medetomidine–Ketamine Anesthesia in New Zealand White Rabbits

Rahime YAYGINGÜL^{1*}, Zeynep BOZKAN¹, Osman BULUT², Ali BELGE¹

¹Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Aydın

²Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Milas Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Muğla

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

ABSTRACT

This study aimed to investigate the effects of premedication with ascorbic acid (vitamin C) on physiologic parameters before medetomidine–ketamine anesthesia in New Zealand white rabbits. A total of 14 rabbits of both sexes, 1-4 months of age and 2-4 kg in body weight, were used in this study. The rabbits were randomly assigned one of two groups: medetomidine–ketamine (MK) or ascorbic acid–medetomidine–ketamine (AAMK). The rabbits in the MK group were given 0.25 mg/kg of medetomidine and 15 mg/kg of ketamine intramuscularly. The rabbits in the AAMK group were given 60 mg/kg of vitamin C intramuscularly 20 min prior to the same dose of medetomidine–ketamine anesthesia. The onset of anesthesia, time of surgical anesthesia, and total anesthesia time in the two groups was recorded. Heart rate, respiratory rate, and body temperature were also recorded at 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 and 60 minutes during anesthesia. Physiologic parameters were not statistically different between the two groups. Pretreatment with vitamin C prior to medetomidine–ketamine anesthesia decreased the duration of onset of anesthesia. As a result, it was concluded that vitamin C can be used prior to anesthesia to accelerate the effect of medetomidine–ketamine in rabbits.

Keywords: anesthesia, rabbit, vitamin C, medetomidine, ketamine

Yeni Zelanda Beyaz Tavşanlarında Medetomidin – Ketamin Anestezisi Öncesi Preanestezik Olarak Vitamin C Kullanılması

ÖZ

Bu çalışmada, beyaz Yeni Zelanda tavşanlarında medetomidin – ketamin anestezisi öncesi preanestezik olarak uygulanan askorbik asitin (vitamin C= vit) fizyolojik parametreler üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Her iki cinsiyette 1-4 aylık ve 2-4 kg vücut ağırlığında sahip toplam 14 tavşan bu çalışma için kullanıldı. Tavşanlar rastgele iki gruba ayrıldı; medetomidin – ketamin (MK) ya da askorbik asit – medetomidin – ketamin (AAMK). MK grubundaki tavşanlara 0.25 mg/kg medetomidin ve 15 mg/kg ketamin intramuscular olarak uygulandı. AAMK grubundaki tavşanlara aynı dozdaki medetomidin-ketamin anestezisinden 20 dk önce 60 mg/kg oranında kas içi C vitamini verildi. İki grupta anestezi başlangıç zamanı, cerrahi anestezi süresi ve total anestezi zamanı kaydedildi. Anestezi sırasında kalp oranı, solunum oranı ve vücut sıcaklığı 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 ve 60 dakikalarda kaydedildi. Fizyolojik parametreler açısından her iki grupta istatistiksel olarak fark belirlenemedi. Sonuç olarak, tavşanlarda medetomidin – ketamin anestezisi öncesi C vitaminin kullanılması anestezi giriş süresini kısalttığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Anestezi, tavşan, vitamin C, medetomidin, ketamin

To cite this article: Yaygingül R. Bozkan Z. Bulut O. Belge A. Use of Vitamin C for Premedication Prior to Medetomidine–Ketamine Anesthesia in New Zealand White Rabbits. Kocatepe Vet J. (2018) 11(4): 463-467.

INTRODUCTION

Rabbits are commonly used as a laboratory animals for experimental surgery. Preanesthetic medication is included as part of the anesthetic protocol because it reduces aggression, fear and pain, provides pre-emptive analgesia, and reduces the amount of medication needed to attain the desired level of anesthesia (Flecknell 1997). Medetomidine is an α_2 -adrenoceptor agonist used in veterinary practice to induces sedation, analgesia and muscle relaxation (Nevalainen et al. 1989; Blum et al. 1992; Cullen 1996). Ketamine is a dissociative anesthetic drug routinely used for induction and maintenance of anesthesia. Because the sole use of ketamine is not sufficient for anesthesia, it is commonly combined with a preanesthetic drug such as medetomidine (Kılıç 2004; Henke 2005; Grint 2008). A combination of medetomidine and ketamine has been reported to provide effective anesthesia in rabbits and is now commonly used with a wide margin of safety in this species. Vitamin C is a water-soluble vitamin that is abundant in many plants and meat (Egwu et al. 2011). Known to be highly concentrated in the brain, the actual physiologic role of vitamin C in the normal functioning of the central nervous system (CNS) remains unclear. Vitamin C influences the CNS physiologically and/or pharmacologically (Laurence et al. 1997; Sauberich 1994). High amounts of vitamin C may produce effects similar to amphetamines in terms of CNS depression (Egwu et al. 2011; Najafpour and Nadeghi-Hashjin 2007).

The purpose of the present study was to investigate the effect with premedication vitamin C on New Zealand White rabbits anesthetized with a medetomidine–ketamine combination.

MATERIALS and METHODS

Animals

Ethical approval (file number: 2017/113) from the university's Institutional Animal Care and Use Committee was obtained prior to the study. A total of 14 rabbits of both sexes, 1–4 months of age and 2–4 kg in body weight, were evaluated in this study. The rabbits were maintained at a room temperature of 18–21°C and 55–65% humidity. The rabbits were allowed to acclimatize for 14 days prior to the study, provided water ad libitum and fed commercial pellet food. Food and water were not withdrawn prior to anesthesia.

Anesthetic protocols

The rabbits were separated randomly into two groups: medetomidine–ketamine (MK group) and ascorbic acid–medetomidine–ketamine (AAMK group) groups. The rabbits in the MK group were given 0.25 mg/kg medetomidine (Domitor®)¹ and 10 min later 15 mg/kg ketamine (Alfamine®)² intramuscularly. Those in the AAMK group were given 60 mg/kg vitamin C (Injacom C®)³ intramuscularly 20 min before medetomidine–ketamine anesthesia. All anesthetic drugs were injected into the quadriceps femoris muscle. The body temperature (°C), heart rate (beats/per min), and respiratory rate (respiration/min) of the rabbits were recorded before anesthesia, immediately after induction, and at 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, and 60 min of anesthesia. The respiratory rate and heart rate were measured with a stethoscope. The body temperature was measured with a digital thermometer. The onset of anesthesia was evaluated in terms of recumbency, diminished respiratory rate, loss of pedal reflexes and loss of pinprick sensation on the skin. Surgical anesthesia time was evaluated in terms of loss of withdrawal and ear-pinch reflexes. The time between the administration of anesthesia and the recovery of all reflexes was referred to as total anesthesia time (Henke et al., 2005).

Statistical analysis

All statistical comparison was performed using SPSS software. Study data were assessed by calculating mean and standard error of the mean (mean \pm SE). Differences were considered statistically significant if *P* value was < 0.05 . Generated data were analyzed by analysis of variance. Differences among mean values were evaluated with the paired-samples *t* test for normally distributed data.

RESULTS

The onset of anesthesia, time of surgical anesthesia, and total anesthesia time are shown in Figures 1, 2, and 3, respectively. The MK group showed a longer onset surgical time of anesthesia, and total anesthesia time compared to the AAMK group but there were no significant differences ($P > 0.05$). The changes in heart rate, body temperature, and respiratory rate are shown in Table 1. No difference between groups was determined in terms of heart rate, respiratory rate, and body temperature. There were statistically significant differences within groups over time.

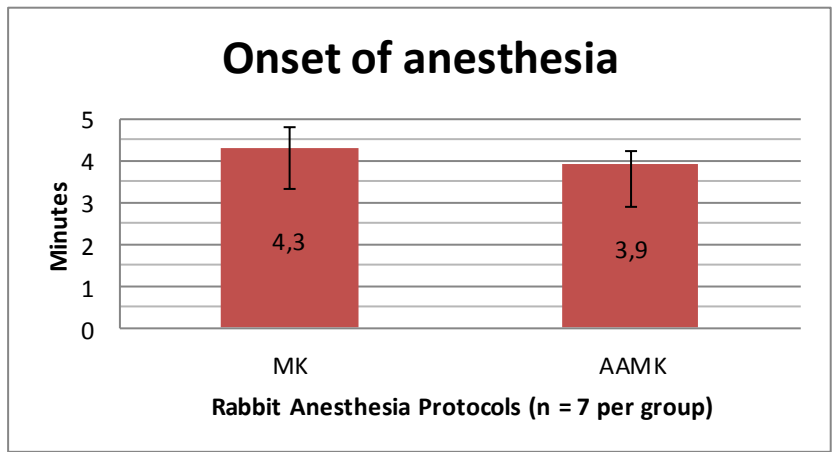


Figure 1. Onset of anesthesia, evaluated in terms of recumbency, diminished respiratory rate, loss of pedal reflexes, and loss of pinprick sensation on the skin MK = medetomidine–ketamine; AAMK= ascorbic acid–medetomidine–ketamine

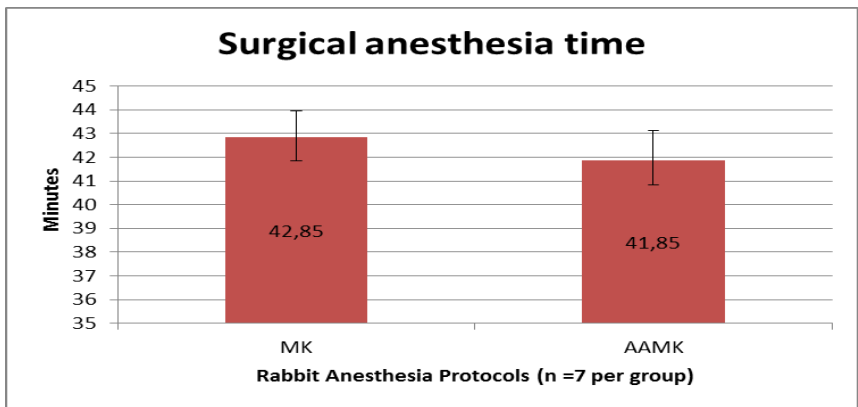


Figure 2. Surgical anesthesia time, evaluated in terms of loss of withdrawal and ear-pinch reflexes MK = medetomidine–ketamine; AAMK= ascorbic acid–medetomidine–ketamine

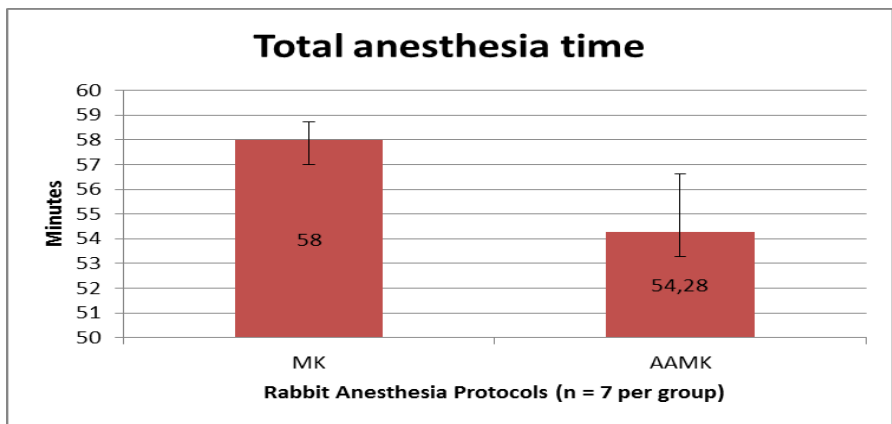


Figure 3. Total anesthesia time, between the administration of anesthesia and recovery of all reflexes MK = medetomidine–ketamine; AAMK= ascorbic acid–medetomidine–ketamine

Table 1. Changes in heart rate, body temperature, and respiratory rate before and during anesthesia

Groups	Medetomidine–Ketamine (n=7)			Vitamin C–Medetomidine–Ketamine (n=7)		
	Body temperature (°C) $\bar{X} \pm s \mathcal{X}$	Respiratory rate (respiration per minute) $\bar{X} \pm s \mathcal{X}$	Heart rate (beats per minute) $\bar{X} \pm s \mathcal{X}$	Body temperature (°C) $\bar{X} \pm s \mathcal{X}$	Respiratory rate (respiration per minute) $\bar{X} \pm s \mathcal{X}$	Heart rate (beats per minute) $\bar{X} \pm s \mathcal{X}$
Baseline Values Pre-anesthesia	39.75 ± 0.305	142.85 ± 13.65	219.42 ± 7.58	40.00 ± 0.069	130.28 ± 6.10	197.42 ± 5.06
At Induction 0 min	39.31 ± 0.353	65.14 ± 4.75***	170.85 ± 7.28*	39.84 ± 0.71	67.85 ± 3.43***	146.28 ± 8.13***
Anesthesia 5 min	38.97 ± 0.370	101.71 ± 16.27*	167.42 ± 10.56*	39.70 ± 0.123	80.00 ± 6.81***	170.85 ± 5.90**
Anesthesia 10 min	39.07 ± 0.544	73.71 ± 8.80**	168.0 ± 9.02**	39.51 ± 0.96*	63.42 ± 5.55***	163.57 ± 6.71**
Anesthesia 15 min	38.84 ± 0.533	75.42 ± 8.39**	165.71 ± 8.36**	39.12 ± 0.156**	58.28 ± 4.43***	177.14 ± 8.36*
Anesthesia 20 min	38.5 ± 0.402**	71.42 ± 12.44**	161.14 ± 8.49**	39.12 ± 0.156**	64.00 ± 6.17***	164.00 ± 5.92**
Anesthesia 25 min	37.98 ± 0.482**	64.57 ± 11.46**	160.00 ± 8.09**	38.84 ± 0.218**	61.71 ± 11.60***	182.57 ± 3.10
Anesthesia 30 min	37.98 ± 0.571**	56.00 ± 7.14***	159.57 ± 5.29***	38.91 ± 0.118***	59.42 ± 9.61***	182.298 ± 2.98
Anesthesia 45 min	37.37 ± 0.589**	66.85 ± 13.02**	161.14 ± 8.31***	38.58 ± 0.138***	59.42 ± 6.95***	152.00 ± 4.0***
Anesthesia 60 min	36.74 ± 0.576***	55.42 ± 5.48***	165.00 ± 7.51***	38.17 ± 0.233***	59.42 ± 6.95***	164.00 ± 8.28**

* Significant difference between anesthesia protocol time points ($P < 0.05$).

** Significant difference between anesthesia protocol time points ($P < 0.01$).

*** Significant difference between anesthesia protocol time points ($P < 0.001$).

DISCUSSION

Vitamin C is a water-soluble micronutrient required for various biological functions. However, the effect of vitamin C on the CNS remains unclear. Its deficiency has been reported to cause impairment of CNS function (Laurence et al. 1997). Previous studies reported that the use of vitamin C for premedication could accelerate the onset of anesthesia and increase the time of surgical anesthesia (Elsa and Ubandawaki 2005; Ito et al. 2014). Elsa and Ubandawaki (2005) administered different doses of vitamin C to rabbits before ketamine anesthesia. They found a statistically significant increase in total anesthesia time with an increasing dose of vitamin C as CNS functions were disrupted. In the present study, the time to onset of anesthesia was slightly longer in the MK group compared to the AAMK group.

Although the duration of total anesthesia was slightly shorter in the AAMK group, no difference was found between the groups most likely due to the low dose of vitamin C used. No complications

occurred while anesthetizing the rabbits. Some studies (Elsa and Ubandawaki 2005; Yanmaz et al. 2016) showed that vitamin C had a depressive effect on the CNS and reduced the heart rate. In the present study, although the decrease in heart rate was statistically significant in both groups, the decrease in the MK group was greater than that in the AAMK group however, no significant difference in heart rate was found between the groups ($P > 0.05$).

Egwu et al. (2011) reported a slight increase in the temperature of rabbits after administering vitamin C most likely due to the modulatory effect of vitamin C. In the present study, the body temperature decreased in both the MK and AAMK groups and there was no statistically significant difference between the two groups ($P > 0.05$). Various studies (Henke et al. 2005; Kılıç 2004) reported a decrease in body temperature following medetomidine administration in laboratory animals. This decreased body temperature was attributed to thermoregulatory failure as a result of the inhibition of limbic–hypothalamic centers and

deterioration of homeostasis following reduced metabolic and muscular activities.

Previous studies (Hedengvist et al. 2001; Hellebrekers et al. 1997) reported that medetomidine-ketamine anesthesia decreased the respiratory rate. In the present study, preinduction respiratory rates (RR) varied between 142.85 ± 13.65 and 130.28 ± 6.10 respirations per minute for the MK and AAMK groups, respectively. RR was significantly below the baseline value during anesthesia in both groups, however, no significant difference in RR was found between the groups ($P > 0.05$). Egwu et al. (2011) reported a decrease in RR after vitamin C administration in rabbits.

In conclusion, the present study showed that while vitamin C administered to rabbits before medetomidine-ketamine anesthesia decreased the duration of anesthesia, physiologic parameters were not statistically different between the two groups. As a result we conclude that vitamin C can safely be used before anesthesia to accelerate the effect of medetomidine-ketamine anesthesia in rabbits.

REFERENCES

- Blum JR, Daunt DA, Hamm TE, Faroghi A, Birusingh K.** Cardio-respiratory effects of medetomidine in rabbits. *Vet Surg.* 1992; 21: 158.
- Cullen LK.** Medetomidine sedation in dogs and cats: a review of its pharmacology and dose. *Brit Vet J.* 1996; 152: 519-35.
- Egwu GO, Mshelia GD, Sanni S, Onyeyili PA, Adeyanju GT.** The effect of vitamin C at varying times on physiological parameters in rabbits after xylazine anesthesia. *Vet Ital.* 2011; 47: 97-104.
- Elsa A, Ubandawaki S.** Ketamine anesthesia following premedication of rabbits with vitamin C. *J Vet Sci.* 2005; 6: 239-41.
- Flecknell PA.** *Laboratory Animal Anaesthesia. A Practical Introduction for Research Workers and Technicians.* London: Academic Press, 1997.
- Grint NJ, Murison PJ.** A comparison of ketamine-midazolam and ketamine-medetomidine combinations for induction of anaesthesia in rabbits. *Veterinary Anaesthesia Analgesia.* 2008; 35: 113-121.
- Hedengvist P, Roughan JV, Orr HE, Antunes LM.** Assessment of ketamine/medetomidine anaesthesia in the New Zealand White rabbit. *Veterinary Anaesthesia Analgesia.* 2001; 28: 18-25.
- Hellebrekers LJ, De Boer EJW, Van Zuylen MA, Vosmeer H.** A comparison between medetomidine-ketamine and medetomidine-propofol anaesthesia in rabbits. *Laboratory Animals.* 1997; 31: 58-69.
- Henke J, Astner S, Brill T, Eissner B, Busch R, Erhardt W.** Comparative study of three intramuscular anaesthetic combinations (medetomidine-ketamine, medetomidine-fentanyl-midazolam and xylazine-ketamine) in rabbits. *Veterinary Anaesthesia Analgesia.* 2005; 32: 261-270.
- Ito J, Otsuki N, Zhang X, Konno T, Kurahashi T, Takahashi M, Yamato M, Matsuoka Y, Yamada K, Miyata S, Fujii J.** Ascorbic acid reverses the prolonged anesthetic action of pentobarbital in Akr1a-knockout mice. *Life Science.* 2014; 95: 1-8.
- Kılıç N.** A comparison between Medetomidine-Ketamine and Xylazine-Ketamine Anaesthesia in rabbits. *Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences.* 2004; 28: 921-926.
- Laurence DR, Bennett PN, Brown MJ.** *Clinical Pharmacology.* 8th ed. London: Churchill Livingstone; 1997.
- Lukasik VM.** Premedication and sedation. In: Seymour C. & Gleed R. *Manual of Small Animal Anesthesia and Analgesia.* Cheltenham: BSAVA, pp.71-85, 1999.
- Najafpour A, Sadeghi-Hashjin G.** Vitamin C pre-medication enhances the anaesthetic effect of ketamine-xylazine combination in the rat. *Archives of Medical Med Science.* 2007; 4: 340-343.
- Nevalainen T, Pyhala L, Voipio, HM, Virtanen R.** Evaluation of anaesthetic potency of medetomidine-ketamine combination in rats, guinea-pigs and rabbits. *Acta Veterinaria Scandinavica.* 1989; 5: 139-143.
- Sauberich HE.** Pharmacology of vitamin C. *Annual Review of Nutrition.* 1994 4: 371-391.
- Yanmaz LE, Doğan E, Okumuş Z, Şenoçak MG, Prastiwi A, Yıldırım F.** Xylazine-Ketamine Anesthesia Following Premedication of New Zealand White Rabbits with Vitamin C. *Kafkas Univ Vet Fak* 2016; 22(1): 115-118.

Manda Sütlerinde ICP-MS ile Metal ve Ağır Metal Seviyelerinin Belirlenmesi[#]

Recep KARA^{1*}, Ulaş ACARÖZ¹, Zeki GÜRLER¹, Sinan İNCE², Damla ARSLAN-ACARÖZ³

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

²Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, Türkiye

³Afyon Kocatepe Üniversitesi, Bayat Meslek Yüksek Okulu, Veteriner Sağlık ve Laborantlık Bölümü, Afyonkarahisar, Türkiye

[#]Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi tarafından "16.KARİYER.138" proje numarası ile desteklenmiş ve "VET-Istanbul GROUP Congress 2017" de (Almaty) özet bildiri olarak sunulmuştur.

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

ÖZ

Manda sütü, gıda teknolojisinde kullanılan sütler arasında en yüksek yağ oranına sahiptir. Günümüzde egzoz dumanı, atık su ile sulama, endüstriyel ve madencilik faaliyetleri gibi birçok nedenden dolayı toprakta önemli miktarda ağır metaller bulunabilmektedir. Bu metaller hayvan ve insan sağlığını önemli ölçüde etkilemektedir. Bu çalışmanın amacı, Afyonkarahisar ilinden toplanan 50 çiğ manda sütünde Al, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, As, Se, Mo, Ag, Cd, Hg ve Pb gibi metallerin/ağır metallerin varlığını ve seviyesini ICP-MS ile belirlemektir. Süt örneklerinde Al, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Se ve Mo seviyesi sırasıyla 0,098; 0,001; 0,042; 0,331; 0,001; 0,076; 4,116; 0,011 ve 0,022 ppm olarak tespit edilmiştir. Ağır metallerin (Pb, As, Ag, Cd ve Hg) ise tespit edilebilir limitin altında olduğu belirlenmiştir. Bu durum, manda yetiştiriciliğinin ve süt üretiminin ağır metal kontaminasyonundan uzak koşullar altında gerçekleştirildiğini göstermektedir. Ayrıca, diğer metal seviyelerindeki farklılıklar hayvanların beslenmesi ve çevresel koşullardan kaynaklanabilir.

Anahtar Kelimeler: Manda, Süt, Ağır Metal, Halk Sağlığı

Determination of Metal and Heavy Metal Residues in Buffalo Milk By ICP-MS

ABSTRACT

Buffalo milk has the highest value of fat ratio among milk used in food technology. Today, a significant amount of heavy metal found in the soil due to many reasons such as exhaust fumes, wastewater irrigation, industrial and mining activities. Therefore, the health of animal and human is significantly affected. The aim of this study was to determine the presence and contamination level of metals/heavy metals as Al, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, As, Se, Mo, Ag, Cd, Hg, and Pb in 50 raw buffalo milk samples obtained from Afyonkarahisar by using ICP-MS instrument. Contamination level of milk samples with Al, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Se, and Mo was detected as 0.098, 0.001, 0.042, 0.331, 0.001, 0.076, 4.116, 0.011, and 0.022 ppm respectively. In addition, contamination level of Pb, As, Ag, Cd, and Hg was determined under LOD. This suggests that buffalo breeding and milk production are performed under suitable conditions preventing from heavy metal contamination. It is also assessed that the quantities and differences in other metal levels detected in the analysis may depend on the feeding of the animals and environmental conditions.

Keywords: Buffalo, milk, heavy metal, public health

To cite this article: Kara R. Acaröz U. Gürler Z. İnce S. Arslan-Acaröz D. Manda Sütlerinde ICP-MS ile Metal ve Ağır Metal Seviyelerinin Belirlenmesi. Kocatepe Vet J. (2018) 11(4): 468-471.

GİRİŞ

Süt proteinleri biyolojik değeri yüksek proteinlerdir (Uzunöz ve Gülşen 2007). İnsanların yeterli ve dengeli beslenmesinde önemli bir yer teşkil eden süt, hayvansal kaynaklı yağ, protein, laktoz, su, mineral, vitamin, enzim, organik asit ve iz elementleri içermektedir. Sütün bileşimi tür içinde ve türler arasında önemli ölçüde değişiklikler göstermektedir. Süt kompozisyonundaki farklılıklar fizyolojik, kalıtım, sağım sıklığı ve çevre faktörlerine bağlıdır (Renner ve ark. 1991, Ayar ve Demirulus 2000, Tekinşen 2000).

Manda sütü diğer sütlerle karşılaştırıldığında daha az su içeren, daha çok kuru madde (mineral, yağ, protein vb.) ihtiva eden besleyici bir gıda maddesidir. Gıda teknolojisi açısından değerli bir süt olarak kabul edilen manda sütü kaymak, tereyağı, yoğurt ve peynir üretiminde kullanılmaktadır. Manda sütü kaymak bağlama özelliği ve renginin diğer sütlere göre daha beyaz olması nedeniyle tercih edilmektedir. Ülkemizde mandacılık yaygın olarak Afyon, Samsun, Sinop, Balıkesir, Çorum, Amasya, Sivas, Muş ve Diyarbakır illeri ve çevrelerinde yapılmaktadır. (Metin 2001, Üçüncü 2004).

Ağır metal kirliliği son yıllarda endüstriyel ve tarımsal kalkınma nedeniyle ciddi bir sağlık sorunu haline gelmektedir (Rajaganapathy ve ark. 2011). Krom, kadmiyum, kurşun ve civa gibi bazı elementlerin yüksek seviyelerinin neden olduğu toksisite iyi bilinmektedir (Llobet ve ark. 2003). Bunların içerisinde en zararlı ağır metaller kurşun, kadmiyum ve civadır. Biyolojik işlevleri olmayan bu metaller her derişimde zehirli olup, organizmada her organ ve dokuda farklı oranlarda birikebilmektedir (Zheljazkov ve Nielsen 1996, Dündar ve ark. 2012). Ayrıca bu ağır metaller düşük konsantrasyonlarda bile hemotoksik, nörotoksik ve nefrotoksik etkiler gösterebilmektedir (Al-Saleh ve ark. 2003).

Süt ve süt ürünlerinde metallerin bulunması ise, özellikle çevresel koşullara ve üretim prosesine bağlı olmaktadır (Anastasio ve ark. 2006). Dünyada ve ülkemizde özellikle inek ve manda sütü (Algan 2002, Özturan 2010, Khan ve ark. 2013, Bilgücü ve ark. 2016, Li ve ark. 2016; Roy ve ark. 2009, El-Ansary 2017) ile süt ürünlerinde (Temurci ve Güner 2006, Seğmenoğlu 2012, Kan 2015) ağır metal varlığına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bu çalışmada Afyonkarahisar ilinden toplanan çiğ manda sütlerinde bazı metal ve ağır metallerin varlığı ICP-MS ile araştırılarak halk sağlığı açısından risk oluşturup oluşturmayacağı değerlendirilmiştir.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Bu çalışmada Afyonkarahisar ilinden Şubat-Mart 2017 tarihlerinde temin edilen 50 adet çiğ manda sütü örneği kullanılmıştır. Nitrik asit çözeltisinde 24 saat bekletilerek ağır metallerden arındırılmış numune kaplarına alınan örnekler soğuk zincir altında laboratuvara getirilmiştir.

Metot

Mikrodalga Yakma

Örnekleri yakma işlemi kapalı sistem mikrodalga yakma metoduna göre yapılmıştır. Bu amaçla; HP-100 teflon kap içerisine 2 ml çiğ süt alınarak üzerine 8 ml % 65'lik nitrik asit ve 1 ml %30'luk hidrojen peroksit eklenmiş ve 15-20 dk bekletilmiştir. Yakma işlemi mikrodalga cihazında (Sineo MDS- 10; Çin) gerekli yakma programı (130°C'de 10 dk, 150°C'de 5 dk ve 180°C'de 10 dk) ayarlanarak uygulanmıştır. Daha sonra çözeltiler ultra distile su ile 50 ml'ye tamamlanarak filtre (25/0,45 µm) edilmiştir. Elde edilen süzöntü okuma işleminde kullanılmıştır.

Okuma-Değerlendirme

Toplanan örneklerdeki metal-ağır metal (Al, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, As, Se, Mo, Ag, Cd, Hg ve Pb) seviyeleri ICP-MS (Agilent 7700x ICP-MS, Kaliforniya, ABD) ile belirlenmiştir. Tespit edilebilen minimum değer 0.0001 ppm'dir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Yapılan çalışmada manda sütlerinde tespit edilen metal seviyeleri Tablo 1'de verilmiştir. Bununla birlikte As, Ag, Cd, Hg ve Pb ise tüm manda sütü örneklerinde tespit edilebilir limitin (0.0001 ppm) altında bulunmuştur.

Örneklerdeki ağır metal seviyelerinin (Pb, As, Ag, Cd ve Hg) Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Tebliği'nde belirtilen limitlerin altında olduğu gözlenmiştir (Anonim 2011). Bu konuda ulusal ve uluslararası yapılan bazı çalışmalara bakıldığında; Algan (2002), Konya yöresinden topladığı inek sütlerinde ağır metal miktarlarını belirlemek amacı ile 61 örnekte ortalama Pb 0,0000001; Cd 0,0000388; As 0.0000839; Se 0.0000331 ve Zn 0.0026681 ppm düzeyinde saptadığını bildirmiştir.

Tablo 1. Manda sütü örneklerinde tespit edilen bazı metal seviyeleri (ppm)
Table 1. The levels of some metals detected in buffalo milk samples (ppm)

n:50	Al	Cr	Mn	Fe	Co	Cu	Zn	Se	Mo
Minimum	<0,0001	<0,0001	0,004	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,322	<0,0001	0,005
Maksimum	1,443	0,015	0,246	3,883	0,002	0,476	9,644	0,034	0,057
Ortalama	0,098	0,001	0,042	0,331	0,001	0,076	4,117	0,011	0,022

Temurci ve Güner (2006), Ankara'dan toplanan 36 süt örneğinde Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Ni miktarlarının sırasıyla ortalama 6; 0,114; 1,016; 4,300; 52,149 ve 2,754 ppm, düzeylerinde olduğunu ve örneklerin hiçbirinde Pb tespit edemediklerini bildirmişlerdir. Özturan (2010) yaptığı çalışmada inek sütü örneklerinde Ca, Na, K, Mg, Cu, Fe, Zn, Pb, Ni ve Mn miktarlarını sırasıyla; 1258,48; 415,51; 1768,58; 107,33; 0,079; 0,640; 1,406; 0,031; 0,034 ve 0,022 ppm düzeylerinde belirlemişlerdir. Kan (2015) Afyonkarahisar ilinin beş farklı noktasından topladığı süt örneklerinden elde ettiği kaymak ve kaymakaltı sütlerinde ağır metal miktarları ICP-MS ile belirlemiştir. Elde edilen kaymak örneklerinde ortalama Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Ba, ve Pb değerleri sırasıyla: 0,36; 0,56; 2,72; 0,08; 0,65; 0,09; 8,27; 0,14; 0,94; 0,17 ve 0,01 ppm belirlemişken numunelerde Mo, Ag ve Cd saptanmamıştır. Bununla birlikte, kaymakaltı sütlerinde ise 0,02; 0,13; 0,52; 0,02; 0,12; 0,02; 2,37; 0,04; 0,17; 0,04; 0,13; 0,01 ppm düzeylerinde tespit ederken Ag ve Cd tespit edilmediğini rapor etmiştir. Bilgücü ve ark. (2016), Çanakkale'nin üç farklı noktasından farklı dönemlerde toplanan çiğ inek süt örneklerinde metal (Mn, Zn, Cr, Cu, Co), ağır metal (Cd, Pb) ve mineral madde (Al, Ca, K, Na, Fe, Mg) düzeylerini İndüklenmiş Eşleşmiş Plazma Atomik Emisyon Spektroskopisi (ICP-AES) ile belirlemişlerdir. Örneklerde Cd, Mn ve Pb içerikleri bakımından dönemler arasında bir farklılık gözlemlendiğini, bölgeler arasında ise bir farklılık görülmediğini bildirmişlerdir. Metal düzeylerinde bölgeden bölgeye farklılık belirlenirken, mineral madde düzeylerinde ise bir değişim olmadığını rapor etmişlerdir.

Roy ve ark (2009) Hindistan Haryana eyaletinin iki farklı bölgesinden topladıkları manda sütlerinde, Pb, Cd, As ve Hg seviyelerinin ortalamalarını sırasıyla 1. bölgede 0,048 ppm; 0,006 ppm; 21,13 ppb ve 0,73 ppb; 2. bölgede ise 0,090 ppm; 0,006 ppm; 18,81 ppb ve 0,43 ppb olarak tespit etmişlerdir. Khan ve ark. (2013), Ekim 2010 - Ocak 2011 arasında toprak, yem ve inek sütü örneklerinde kurşun (Pb) miktarını belirlemek amacıyla birleştirilmiş atomik absorpsiyon spektrofotometre ile grafit fırın tekniğini kullanmışlardır. Örneklerde Pb konsantrasyonlarını toprakta 1,2-3,5 ppm, yemde 0,33-0,70 ppm ve

sütte 0,018-0,050 ppm aralığında tespit etmişler ve bu örneklerde Pb konsantrasyonunun zamana bağlı olarak azaldığını bildirmişlerdir. Li ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada, 2012-2014 yılları arasında Çin'in Tangshan şehrinden doğrudan çiftliklerden topladıkları toplam 205 çiğ inek sütlerinde ağır metallerden As, Pb, Cr ve Hg düzeylerini belirlemeyi amaçlamışlardır. Analiz edilen örneklerdeki ağır metal düzeylerinin Çin Hükümeti tarafından belirlenen maksimum limitleri aşmadığını ve dolayısıyla çiğ sütlerin insan sağlığı açısından nispeten güvenli olduğunu bildirmişlerdir. El-Ansary (2017) Mısır'da topladığı 12 adet manda sütü örneğinde atomik absorpsiyon spektrofotometresi kullanarak Cd seviyesini ortalama 0,3084 ppm, Pb seviyesini ortalama 0,05878 ppm seviyesinde tespit etmiştir.

Bu çalışmada analize alınan manda sütlerinden elde edilen ağır metal varlığı bulguları ile diğer araştırmacıların sonuçları benzerlik göstermektedir. Çalışmada manda sütlerinde Al, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Se ve Mo gibi metallerin farklı seviyelerde tespit edilmesinde hayvanlara verilen rasyonun veya meraların metal içeriği ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Hatta bazı iz elementleri (Fe, Co, Zn, Se) içermiş olması sütün besleyici değerini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte Pb, As, Ag, Cd ve Hg'nin tespit edilebilir limitin altında olması, manda sütü tüketiminin ağır metaller yönünden insan sağlığı açısından risk oluşturma ihtimalinin düşük olduğu görülmektedir.

SONUÇ

Sonuç olarak, analize alınan manda sütlerinde Al, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Se ve Mo miktarları farklı seviyelerde tespit edilirken, Pb, As, Ag, Cd ve Hg ise saptanamamıştır. Buna göre toplanan süt örnekleri Türk Gıda Kodeksi'ne uygun bulunmuştur. Özellikle örneklerde Pb, As, Ag, Cd ve Hg gibi risk oluşturabilen metallerin tespit edilmemiş olması sütlerin ağır metal yönüyle halk sağlığı açısından risk oluşturmayacağı görülmektedir. Bu riskli ağır metallerin süt ve ürünlerindeki konsantrasyonunun bu seviyede kalabilmesi için bilinçli ve kontrollü bir üretim devam ettirilmesi gerekmektedir. Bu bağlamda ayrıca çiftçi ve işletmecilerin bilgilendirilmesi,

eğitimlerin düzenlenmesi ve son olarak rutin kontrollerin düzenli bir şekilde devam etmesi tavsiye edilmektedir.

KAYNAKLAR

- Algan G.** Konya Yöresi Süt Örneklerinde bazı ağır metallerin incelenmesi, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. 2002.
- Al-Saleh I, Shinwari N, Mashhour A.** Heavy Metal Concentrations in the Breast Milk of Saudi Women. *Biological Trace Element Research*, 2003; 96(1-3): 21-37.
- Anastasio A, Caggiano R, Macchiato M, Paolo C, Ragosta M, Paino SV, Cortesi M L.** Heavy Metal Concentrations in Dairy Products from Sheep Milk Collected in Two Regions of Southern Italy. *Acta Ve. Scand*, 2006; 47: 69-74.
- Anonim.** Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği, Sayı : 28157, 29.Aralık.2011.
- Ayar A. Demirulus H.** Eğitim çağındaki gençlerin süt ve süt ürünleri tüketim alışkanlıklarının belirlenmesi üzerine bir araştırma. *Gıda*, 2000; 25(5): 371-376.
- Bilgücü E. Kaptan B. Palabıyık İ. Öksüz Ö.** The Effect of Environmental Factors on Heavy Metal and Mineral Compositions of Raw Milk and Water Samples. *JOTAF/Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2016; 13(4): 61-70.
- Dündar MŞ. Altundağ H. Kaygaldurak S. Şar V. Acar A.** Çeşitli endüstriyel atık sularda ağır metal düzeylerinin belirlenmesi. *SAÜ. Fen Bilimleri Dergisi*, 2012; 16(1): 6-12.
- El-Ansary MA.** Determination of Heavy Metals Content (Cadmium and Lead) in Raw Cow's and Buffalo's Milk. *Int. J. Curr. Res. Biosci. Plant Biol.* 2017; 4(8): 116-120.
- Kan F.** Afyon Manda Kaymağı ve Kaymakaltı Sütlerinde Bazı Ağır Metallerin ICP-MS ile Araştırılması. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi. 2015.
- Khan ZI. Ahmad K. Bayat A. Mukhtar MK. Sher M.** Evaluation of lead concentration in pasture and milk: A possible risk for livestock and public health. *Pakistan Journal of Zoology*, 2013; 45(1): 79-84.
- Li A. Du R. Zheng B. Meng J. Zhang J. Xiang A. Zhang X. Qi B. Wu Y. Zhou X. Zhang Y. Dong L. Pang X.** Determination of Heavy Metals in Raw Milk Produced in Tangshan City, China. In MATEC Web of Conferences (Vol. 39). *EDP Sciences*, 2016.
- Llobet JM, Falco G, Casas C, Teixido A, Domingo JL.** Concentrations of Arsenic, Cadmium, Mercury and Lead in common foods and estimated daily Intake by children, adolescents, adult and seniors of Catalonia, Spain. *J. Agric. Food Chem*, 2003; 51: 838-842.
- Metin M.** Süt Teknolojisi, Sütün Bileşimi ve İşlenmesi. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları No: 33. Ege Üniversitesi Basımevi, 802 s., Bornova, İzmir. 2001.
- Özturan K.** Erzurum ve çevresinde üretilen süt ve süt ürünlerinin mevsimlere göre mineral madde ve ağır metal içeriği. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. 2010.
- Rajaganapathy V, Xavier F, Sreekumar D, Mandal PK.** Heavy Metal Contamination in Soil, Water and Fodder and their Presence in Livestock and Products: A Review. *Journal of Environmental Science and Technology*, 2011; 4: 234-249.
- Renner E. Schaafsma G. Scott KJ.** Micronutrients in milk. *Food Science and Technology Abstracts*, 1991; 23(11): 11-17.
- Roy D. Bharathidhasan S. Mani V. Kaur H. Kewalramani N.** Heavy Metal Contents in Cow and Buffalo Milk Samples from Haryana. *Indian J. Anim. Nutr.* 2009; 26(1): 29-33.
- Seğmenoğlu MS.** Türkiye'de Tüketime Sunulan Organik Ve Geleneksel Süt Ve Süt Ürünlerinin Bazı Metal Düzeyleri Yönünden Karşılaştırılması. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. 2012.
- Tekinşen OC.** Süt Ürünleri Teknolojisi 3. Baskı Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya. 2000.
- Temurci H. Güner A.** Ankara'da tüketime sunulan süt ve beyaz peynirlerde ağır metal kontaminasyonu., *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.* 2006; 1(1-2): 20-28.
- Uzunöz M. Gülşen M.** Üniversite öğrencilerinin süt ve süt ürünleri tüketim alışkanlıklarının belirlenmesi. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi* 2007; 3: 15-21.
- Üçüncü M.** A'dan Z'ye Peynir Teknolojisi. Cilt II. Ege Üni. Mühendislik Fak. Gıda Müh. Bölümü, 1233 s., İzmir. 2004.
- Zheljzakov VD. Nielsen NE.** Effect of heavy metals on peppermint and cornmint. *Plant and Soil*. 1996; 178 (1): 59-66.

Farklı Esansiyel Yağların Vakum Paketlenmiş ve Soğukta Depolanmış Karidesler Üzerinde Duyusal ve Kimyasal Etkileri[#]

Süleyman ONER¹, Yasemin BİRCAN YILDIRIM^{2*}

²İskenderun Teknik Üniversitesi, Deniz Bilimleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, 1200 İskenderun, Hatay, Türkiye

¹Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Milas MYO, Otel Lokanta ve İkrâm Hizmetleri Bölümü, 48200, Milas, Muğla, Türkiye

[#]Bu çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeler (BAP) birimi tarafından desteklenen Doktora Tez Çalışmamdan elde edilmiştir.

*Corresponding author e-mail: suleymanoner@mu.edu.tr

ÖZET

Bu çalışmada Akdeniz ve Ege sahillerimizde yaygın olarak bulunan yeşil kaplan karidesinin [*Penaeus semisulcatus*, (De Hann 1844)] farklı esansiyel yağ asitleriyle muamele edilerek raf ömrünün uzatılması amaçlanmıştır. Buzdolabında farklı esansiyel yağ asitleriyle muamele edilerek vakum pakette depolanan karides grupları 0.,4.,8.,12.,16.,20.,24. günlerinde kimyasal ve duyusal kalite değerlendirmeleri yapılmıştır. Kimyasal değerlendirmede pH değerlendirmesine göre kontrol grubu 8. günde, karvakrol ile muamele edilen grup 20. günde, timol ve eugenol ile muamele edilen gruplar 24. günde, Toplam Uçucu Bazik Azot (TVB-N) değerlendirmesine göre kontrol grubu 8. günde, karvakrol grubu 16. günde, timol ve eugenol ilave edilen gruplar 20. günde ve Trimetilamin Azot Tayini (TMA-N) değerlendirmesine göre, kontrol grubu 8. günde, karvakrol grubu 16. günde, timol ve eugenol gruplarının 20. günde raf ömrünü tamamladığı belirlenmiştir. Duyusal değerlendirmede, kontrol grubu görünüş ve koku değerleri açısından 8. günde ve tat değeri açısından 4. günde raf ömrünü tamamlarken, karvakrol içeren grubun görünüş ve koku değerlerinin 20. günde, tat değerlerinin ise 16. günde raf ömrünü tamamladığı belirlenmiştir. Timol grubunun görünüş, koku ve tat bakımından raf ömrünü 24. günde tamamladığı belirlenmiştir. Eugenol grubunun duyusal değerlendirmesine bakıldığında, görünüş olarak 24, koku ve tat olarak 20. günde raf ömrünü tamamladığı belirlenmiştir. Bu duyusal değerlendirme sonuçları pH, TVB-N, TMA-N değerlendirmesi sonuçları ile paralellik göstermektedir. Timol ile muamele edilen grup duyusal olarak daha iyi olduğu için su ürünlerinin korunmasında timol kullanımı önerilmektedir. Literatür taramalarında ülkemizde karideslerde henüz böyle bir çalışmanın yapılmadığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Karides, Esansiyel Yağlar, Raf ömrü

The Chemical and Sensory Effects of Different Essential Oils on Vacuum Packaged and Cold Stored Shrimps

ABSTRACT

The aim of this study was to increase shelf life of shrimps [*Penaeus semisulcatus*, (De Hann 1844)] found commonly in the mediterranean and aegean sea, by treating with different essential oils. Treated and vacuum packaged shrimp were examined as chemical and sensory within 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, days of refrigerated storage. At the limit of the pH acceptability, 8. days for control, 20. for carvacrol and 24. for thymol and eugenol groups, according to Total Volatile Basic Nitrogen (TVBN) values, 8. days for control, 16. for carvacrol, 20. for thymol and eugenol groups, regarding to Trimethylamine-Nitrogen (TMAN) values, 8.days for control, 16. for carvacrol, 20. for thymole and eugenol groups were completed the shelf life. The control extended the shelf life 8. for appearance and odor, 4. days for taste. Carvacrol group reached the shelf life 20. for appearance and odor, 16. for taste evaluation. The shelf life of eugenol group was at 24. for appearance, odor and 20. days for taste. In the respect to appearance and odor, taste, the thymole used group completed shelf life at 24. days. The result of sensory evaluation showed the similar shelf life related days with pH, TVBN, TMAN values. Thymole was advised for consumer due to higher sensory evaluation. It has been determined that there was not a study like this one on shrimp at literature in Turkey.

Keywords: Shrimp, Essential oils, Shelf life

To cite this article: Oner S, Yıldırım Y.B. Farklı Esansiyel Yağların Vakum Paketlenmiş ve Soğukta Depolanmış Karidesler Üzerinde Duyusal ve Kimyasal Etkileri. Kocatepe Vet J. (2018) 11(4): 472-478.

GİRİŞ

Türkiye denizlerinde bugüne kadar 60'ın üzerinde karides türü saptanmış olup, bunlardan 7'sinin ticari olarak avcılığı yapılmaktadır. Bu türlerden *Penaeus semisulcatus*, *Metapenaeus monoceros* Kızıl Deniz kökenli olup, Akdeniz ve Ege sahillerimizde yaygın olarak bulunur (Kocataş ve ark. 2004, Can ve ark. 2006).Avlandıktan sonra kısa sürede bozulabilen karideslerin hemen işlenmeleri ya da dondurularak muhafazaya alınmaları gerekmektedir (Ünlüsayın ve Gülyavuz 2008). Diğer taraftan, uzun süreden beri, besinlerin koku ve tat gibi özelliklerini arttırmak için katkı maddesi olarak kullanılan baharat ve doğal aromatik bitkilerin kullanımı giderek önem kazanmaktadır. Gıdaların taze olarak muhafaza edilebilmesi için doğal katkı maddeleri olarak, esansiyel yağların kullanımı yaygınlaşmıştır (Fernandez-Lopez ve ark. 2005). Yapılan çalışmalarda, esansiyel yağlarla muamele yapılması ve vakum paketlenmesi sonucu su ürünlerinin raf ömrünü arttırmada iyi sonuçlar alınmıştır (Karaman ve ark. 2001, Kykkidou ve ark. 2009, Frangos ve ark. 2010, Mastromatteo ve ark. 2010). Çalışmada kullanılan esansiyel yağlardan Timol (C₁₀H₁₄O) 5-methyl-2- isopropylphenol olarak adlandırılır ve monoterpener grubuna aittir (Lambert ve ark.2001). Kimyasal yapı olarak, 2-methyl-5-1-methylethyl phenol olarak adlandırılan karvakrol monoterpenerik bir fenoldür (Lee ve Jin 2008). Eugenol ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada karanfilin güçlü antioksidatif etki gösterdiği ortaya konmuştur (Lean ve Suhaila 1999). Bu çalışmanın amacı farklı esansiyel yağların vakum paketlenmiş ve soğukta depolanmış karidesler üzerinde duyuusal ve kimyasal etkileri araştırılmasıdır.

MATERYAL ve METOT

Yapılan mevcut çalışmamızda; kekikten elde edilen karvakrol, timol ve karanfilden elde edilen eugenol esansiyel yağlarının %1 oranındaki çözeltisi, İskenderun Körfezi'nde avlanan *Penaeus semisulcatus* türü karideslere muamele edilmiş, vakum pakette +4°C'de 24 gün depolanmış ve bu süre boyunca kimyasal, duyuusal parametrelerine bakılarak raf ömrü incelenmiştir. Trol ağlarıyla avlanan karidesler İskenderun Balıkçı Barınağı'ndan sulu buz dolu strafor kutular içerisinde laboratuvara ulaştırılmıştır. Araştırmada timol (Sigma Aldrich T0501), karvakrol (Sigma Aldrich 282197) ve eugenol (Sigma Aldrich E51791) esansiyel yağları %1 oranında kullanılmıştır. Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Laboratuvarına getirilen karideslerin ortalama 13-18 cm boyunda ve 30-50 g ağırlığında olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda I. grup; %1 timol, II. grup; %1 karvakrol, III. grup; %1

eugenol uygulanan gruplar, IV. grup ise kontrol olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda kontrol grubu ve esansiyel yağlarla muamele edilmiş gruplar hazırlanırken, her bir paket karides, 100 g lık olacak şekilde polyamid bazlı vakum poşetleri içine yerleştirilmiş ve vakum makinesi (Laica SPA-Viale del Lavarro, 1036020 Barbarano- Vicenza-Italy) kullanılarak vakum paketlenme yapılmıştır. Vakum paketlenen örnekler buzdolabı ortamında homojen olarak yerleştirilmiş ve depolanmıştır. Tüm analizler iki paralelli ve üç tekerrürlü olarak yapılmıştır. Çalışmada elde edilen veriler her analiz gününde her bir grup için üç paket karides filetosu kullanılarak elde edilmiştir. 0., 4., 8., 12., 16., 20., 24. günlerde duyuusal, kimyasal analizler yapılmıştır. pH ölçümü Santos ve ark. (1981), Toplam Uçucu Bazık Azot (TVB-N) analizi Antonacopoulos (1973), Trimetilamin Azot Tayini (TMA-N) ise Boland ve Paige (1971)'e göre yapılmıştır. Duyusal analiz değerlendirmesi (Neuman ve ark. 1985, Varlık ve ark. 1993a) göre yapılmıştır (Çizelge.1). Varlık ve ark. (1993a)'na göre duyuusal analiz puanlamasında 3 ile 4 arası puan alan su ürünleri örnekleri "Kötü" olarak değerlendirilmiştir. Ürünün duyuusal değerlendirilmesinde Mustafa Kemal Üniversitesi öğretim üyeleri ve lisansüstü öğrencilerinden oluşan, daha önce bu tür çalışmalara katılmış olan tecrübeli 5 panelist görev almıştır. Karides etleri çiğ ve pişmiş şekilde tabaklarda panelistlere sunulmuştur. Duyusal analiz için ürünün renk, koku, tat, ve genel kabul edilebilirlik kriterleri baz alınarak 0-9 aralığında değerlendirilmiştir. Ayrıca karides etinin duyuusal analizlerinde numuneler pişirme denemeleri ile incelenmiştir. Pişirme denemelerinde ağzı kapaklı kaplara konulan karides 10 dakika süre ile 90 ± 3°C'de su banyosunda tutularak, muamelelerde renk, koku ve tat kabul edilebilirlik dereceleri tespit edilmeye çalışılmıştır.

İstatistiki Analizler

Standart sapma ve korelasyon varyasyonu için, her bir depolama günü ve muamele gruplarının üç tekrarlı olarak karşılaştırması yapılmıştır. Kimyasal analizlerin sonuçlarına SPSS 16.00 istatistik programında Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Duyusal analiz sonucu elde edilen veriler SPSS istatistik paket programında non-parametrik bir test olan "Kruskal-Wallis" ve Duncan çoklu karşılaştırma yöntemine göre yapılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

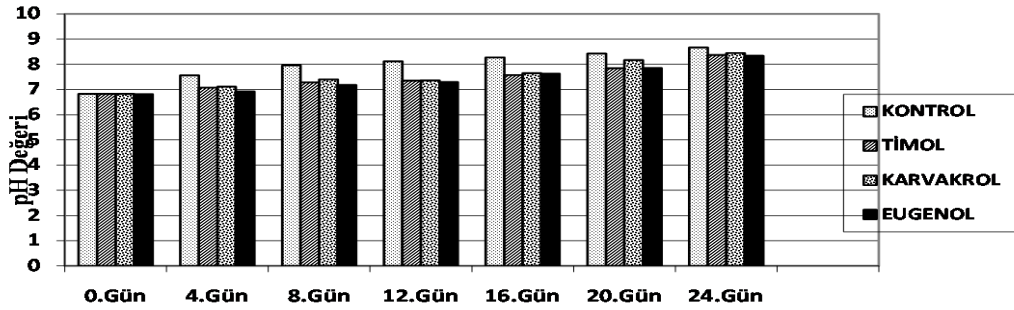
Depolama süresi boyunca pH değeri 6.81 ile 8.67 arasında değişim göstermiştir. Tüm gruplarda depolama süresince pH değerinde istatistiksel olarak önemli farklılıklar görülmüştür (Şekil. 1). Shamshad ve ark. (1990a) belirlediği pH bozulma

limiti 7,95 değeri olup, kontrol grubu bu değeri 8. günde (7,96), karvakrol ile muamele edilen grup 20. günde (8,17), timol uygulanan grup 24. günde (8,37) ve eugenol uygulanan grup ise 8,34 pH değeri ile bozulma limitini 24. günde aşarak raf ömrünü tamamlamışlardır. Şentürk (1994) taze karidesin pH'sının yaklaşık 7-7,2 arasında olduğunu, pH'ın depolama süresince artarak kokuşma evresinde 8,2'ye kadar yükseldiğini bildirmiştir. Varlık ve ark. (2000) ise taze karideslerin pH değerinin 6,73 olduğunu 4°C'deki karideslerin ise 4.üncü günde 7,81'e yükseldiğini ifade etmişlerdir. Bilgin ve Erdem (2006), karideslerin [*Crangon crangon* (Linnaeus, 1758)] pH değerini pişmiş karideslerde deneme başında $6,64 \pm 0,05$ tespit etmiş iken, çiğ karideslerde $6,83 \pm 0,04$ olarak saptamışlardır. Deneme sonunda (5.gün) ise, pişmiş karideslerde pH $7,77 \pm 0,05$ bulunmuş iken çiğ karideslerde $7,95 \pm 0,01$ olarak belirlenmiştir. Muhafaza süresince artışların istatistiki olarak önemli olduğunu bulmuşlardır. Çalışmamızda elde edilen pH değeri raf ömrü sonlanma günü değerlendirmesine göre Shamshad ve ark. (1990b), Varlık ve ark. (2000), Erdem ve Bilgin (2004)'nın çalışma sonuçlarına benzerlik göstermektedir. Huss (1988), balık ve su ürünlerinin TVB-N değeri, 35 mg/100g'ı aştığında "Bozulmuş" olarak tanımlamıştır. Buna göre çalışmamızda kontrol grubu 8. günde 58,09 mg/100g, karvakrol uygulanan grup 16. günde 35,24 mg/100g, timol ile muamele edilen grup 20. günde 43,86 mg/100g, eugenol uygulanan grup ise 20. günde 42,44 mg/100g TVB-N miktarı ile kritik limit değeri olarak baz alınan 35 mg/100g'ı aşmıştır. Çalışmamızda kontrol grubunda karides etinin başlangıç TVB-N değeri 8,24 mg/100g olarak bulunmuştur. Başlangıç TVB-N değerleri tüm gruplarda birbirine yakın olmasına rağmen, uygulanan esansiyel yağ çeşidine göre depolama sürecinde önemli değişiklik göstermiştir (Şekil.2). Gruplar arasında TVB-N bakımından istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulunmuştur. Çalışmamızda bulunan sonuçlar Chang ve ark. (1983)'nin çalışması ile benzerlik göstermektedir. Diğer çalışmalarla, (Stockemer ve Niger 1984, Shamshad ve ark.1990b) çalışmamızdaki, TVB-N değeri farkının, çeşitli su ürünlerinin cinsi, avlanma mevsimi, olgunluk derecesi, cinsiyeti ve yaşı gibi faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Literatür taramalarında ülkemizde karideslerde henüz böyle bir çalışmanın yapılmadığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda taze karides başlangıç TMA-N değeri $0,93 \pm 0,03$ mg/100g olarak bulunmuştur. Depolama süresince TMA-N değerinde önemli artışlar gözlenmiştir (Şekil.3). Uygulama gruplarının kendi aralarında ve günler arası istatistiksel olarak farklılıklar gözlenmiştir. Varlık ve ark. (1993b) tüketime uygun su ürünlerinde TMA-N değerinin 1-8 mg/100g

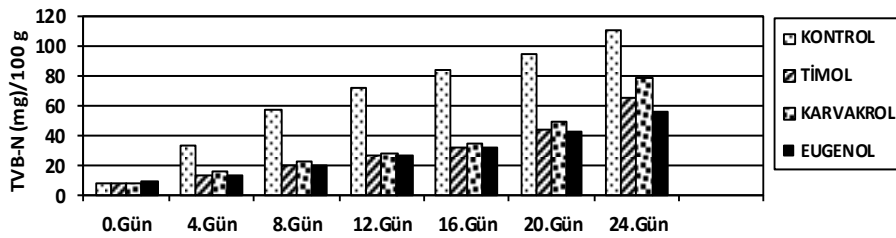
olduğunu, 8 mg/100g TMA-N değerinin ise bozulmuşluğu belirlediğini saptadıklarını bildirmişlerdir. 8 mg/100 g TMA-N değeri bozulma kriteri olarak ele alındığında, çalışmamızda kontrol grubu 8. günde 8,30 mg/100g, karvakrol ile muamele edilen grup 16. günde 8,18 mg/100g, timol uygulanan grup 20. günde 8,33 mg/100g ve eugenol uygulanan grup ise 20. günde 8,21 mg/100g ile bu limit değeri aşmış olup raf ömrünü tamamlamıştır. TMA-N sonuçlarının, pH, TVB-N değerlerinin benzerlik göstermesi, kimyasal değişim parametrelerin raf ömrünü belirlemede birbirini doğrulayıcı olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda bulunan sonuçlar, Varlık ve ark.1993b, Stockemer ve Nieper. (1984), Bilgin ve ark. (2006)'nın çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Çalışmamız, karides etlerinin esansiyel yağ asitleriyle muamele edilmesi, vakum paketlenmesi ve soğukta depolanarak kimyasal ve duyuşal değişimlerin gözlemlenmesiyle, Ülkemizde şimdiye kadar yapılan benzer çalışmalardan ayrılmaktadır. Çalışmamızda başlangıçta yüksek olan duyuşal değerler zamanla azalma göstermiş ve 4 puanın altına düştüğünde kötü ve duyuşal olarak kabul edilemez olarak puanlanmıştır. Buna göre kontrol grubu görünüş açısından 3,82 ve koku 3,52 puan olarak 8. günde ve tat olarak 4. günde 3,70 puanla raf ömrünü tamamlamıştır. Karvakrol uygulanan grup ise görünüş 3,79 ve koku 3,96 puanla 20. günde, tat değerlerine bakıldığında ise 16. günde 3,78 puanla raf ömrünü tamamlamıştır. Timol ile muamele edilen grup ise görünüş 3,87, koku 3,76 ve tat 3,92 puanla raf ömrünü 24. günde tamamlamıştır. Eugenol uygulanan grup ise duyuşal değerlendirmeye bakıldığında görünüş 3,40 olarak 24. günde, koku 3,56 ve tat 3,64 puanla 20. günde raf ömrünü tamamlamıştır (Şekil.4, Şekil.5, Şekil.6, Şekil.7). Bu duyuşal değerlendirme sonuçları pH, TVB-N değerleri ile raf ömrü tamamlama günleri bakımından benzerlik göstermektedir. Erdem ve Bilgin (2004)'in çalışmasında duyuşal bulgulara göre 4°C±1'de muhafaza edilen pişmiş karidesler 3 gün, çiğ karidesler ise 2 gün tazeliklerini korumuşlardır. Matches (1982)'a göre 5,6°C'de karideslerin duyuşal açıdan 6. güne kadar tüketilebilir düzeyde olduğu belirtilmiştir. Varlık ve ark. (2000)'a göre 4°C±1'de muhafaza ettikleri karideslerin, duyuşal olarak 2. günde bozuldukları belirlenmiştir. Stockemer ve Nieper (1984) 7°C'de depolanan karideslerin, duyuşal değerlere göre tüketilebilir sınır değerini 4. günde aştığını bildirmişlerdir. Literatür verileriyle bulgularımız arasında bazı farklılıkların bulunmasının, incelenen karides türü ve muhafaza koşullarından (vakum paketlenme, esansiyel yağ asitlerle muamele) kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

Çizelge 1. Duyusal analiz değerlendirme formu (Neuman ve ark., 1985., Varlık ve ark., 1993a).
Table 1. Sensory Evaluation Form (Neuman and et al., 1985., Varlık and et al., 1993a).

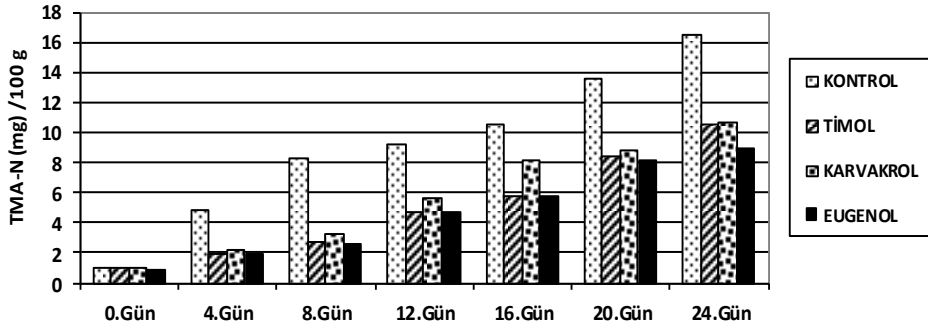
	VERİLEN PUAN								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
GÖRÜNÜŞ									
Etin rengi beyazımsı, soluk beyaz yada çok hafif bir renklenme									
Değişik (hafif) tonlarda grimsi									
Kuvvetli renklenme									
KOKU									
Hoş, spesifik									
Yavan, tatsız, bayat									
Balıksı, ağır									
Kötü koku									
Keskin kötü koku, amonyağımsı									
TAT									
Çok iyi, spesifik-aromatik									
İyi									
Orta									
Balıksı, nahoş, hafif acı									
Kuvvetli balığımsı, acı									
Kuvvetli balığımsı, acı									
Çok kötü, iğrenç									
Genel Kabul Edilebilirlik									



Şekil 1. Buzdolabında depolama boyunca karides etinde pH değişimi
Figure 1. pH values variation during refrigerated storage

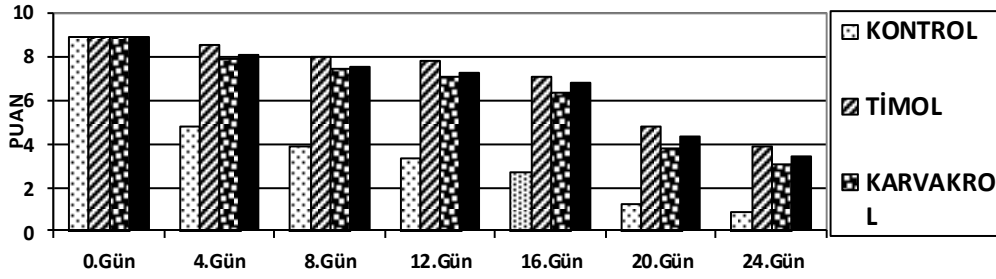


Şekil 2. Buzdolabında Depolama boyunca karides etinde TVB-N Değişimi
Figure 2. TVB-N values variation during refrigerated storage



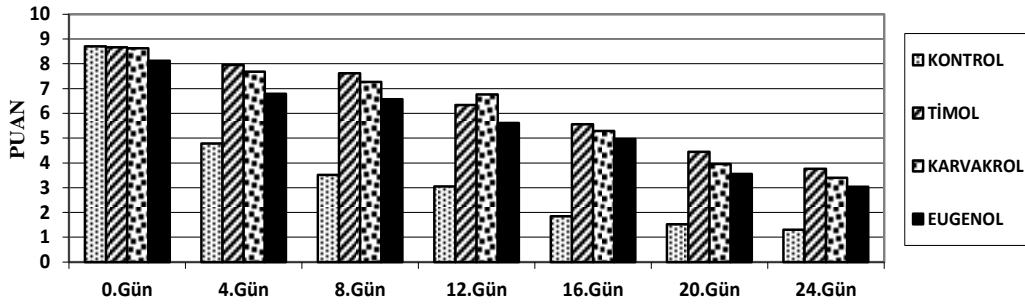
Şekil 3. Buzdolabında Depolama boyunca karides etinde TMA-N miktarındaki değişiklikler

Figure 3. TMA-N values variation during refrigerated storage



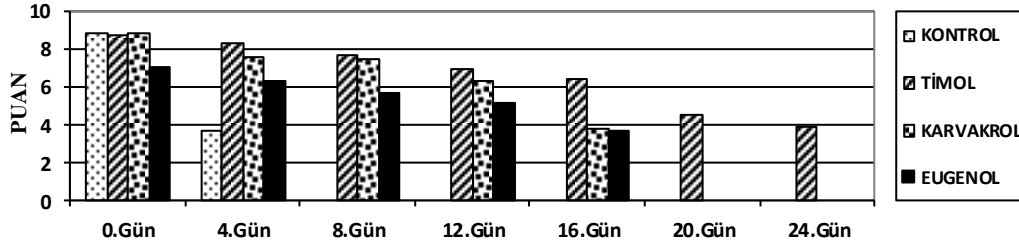
Şekil 4. Buzdolabında Depolama boyunca karides etinde görünüş testi değerindeki değişimler

Figure 4. Appearance values variation during refrigerated storage

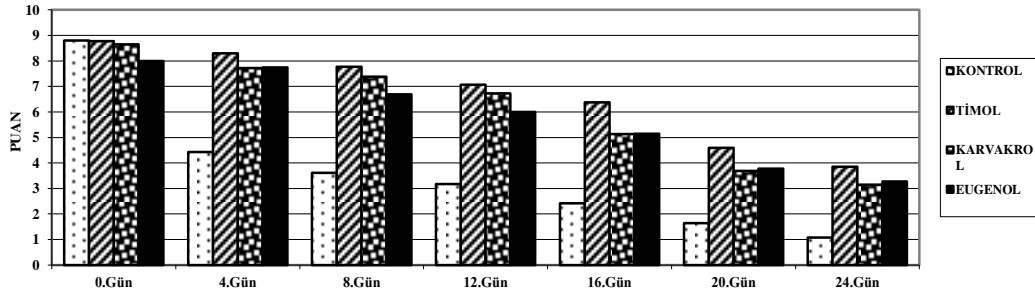


Şekil 5. Buzdolabında Depolama boyunca karides etinde koku testi değerindeki değişimler

Figure 5. Odor values variation during refrigerated storage



Şekil 6. Buzdolabında Depolama boyunca karides etinde tat testi değerindeki değişimler
Figure 6. Taste values variation during refrigerated storage



Şekil 7. Buzdolabında Depolama boyunca karides etinde oluşan genel kabul edirlilik
Figure 7. General acceptability values variation during refrigerated storage

SONUÇ

Duyusal değerlendirme sonuçları pH, TVB-N, TMA-N değerlendirmesi ile paralellik göstermektedir. Kimyasal parametrelere bakıldığında raf ömrü açısından eugenol uygulanan grup her ne kadar uzun raf ömrü sağlamış olsada timol uygulaması duyuşal olarak ve ürünlerin satış imkânları açısından daha iyi olduğu için, timol uygulamasının, su ürünlerinde raf ömrünü arttırmak için esansiyel yağ uygulaması olarak tercih edilebilir olduğu görülmüştür. Daha ileride yapılacak çalışmalarda, farklı gaz oranlarını içeren paketleme ve farklı dozları kapsayan her yörenin kendi damak tadına yakın olan esansiyel yağ kullanılarak ve daha düşük sıcaklık derecesinde daha uzun süreli mevsimsel değişimleri içerecek şekilde denemeler yapılabilir.

KAYNAKLAR

- Antonacopoulos N.** Comparison of Sensory and Objective Methods for Quality Evaluation of Fresh and Frozen Saltwater Fish. Fish Inspection and Quality Control. Fishing News Books. 1973.;80- 181.
- Bilgin S, Erdem ME ve Duyar HA.** Pişmiş ve Çiğ Olarak Buzdolabı Sıcaklığında Muhafaza Edilen Kahverengi Karides'in, Crangon Crangon (Linnaeus, 1758), Kimyasal Kalite

Değişimleri. Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Der. 2006;18 (2): 171-179.

- Boland FE and Paige DD.** Collaborative Study of a Method for the Determination of Trimethylamine Nitrogen in Fish. Jour. of the AOAC. 1971; 4 (3): 725-727.
- Can MF, Aktaş M ve Demirci A.** Kuzey-doğu Akdeniz'in Derin Sularında Bulunan *Plesionika martia* (A.Milne-Edwards, 1883) (Decapoda: Pandalidae)'nın Populasyon Yapısı ve Verimliliği Üzerine Bir Ön Çalışma. E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences. 2006; 23 (1/3): 365-367.
- Chang O, Ceuk WL, Nikelson R, Martin R and Finne G.** İndole in Shrimp Effect of Fresh Storage Temperature Freezing and Boiling. Journal of Food Science. 1983; 48: 813-816.
- Erdem ME ve Bilgin S.** Pişmiş ve çiğ olarak buzdolabı sıcaklığında muhafaza edilen karides (*Palaemon adspersus* Rathke, 1837)'in kalitesinde meydana gelen değişimler üzerine araştırmalar. F.Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi. 2004; 16(4), 687-694.
- Frangos L, Pyrgotou N, Giatrakou V, Ntzimani A and Savvaidis IN.** Combined effects of salting, oregano oil and vacuum-packaging on the shelf-life of refrigerated trout filets. Food Microbiology.

- Fernandez-Lopez j, Zhi N, Aleson-Carbonell I, Perez-Alvarez, A, Kuri V.** Antioxidant and antibacterial activities of natural extract, application in beef meatballs. *Meat Sci.* 2005; 69 (3),371-380.
- Huss HH.** Fresh Fish: Quality and Quality Changes. Rome: Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations. 1988; 132p.
- Karaman S, Digrak M, Ravid U and İlçim A.** Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology.* 2001; 76:183-86.
- Kocataş A, Katağan T, Sezgin M, Kırkım F and Koçak C.** Crustacean Diversity of the *Cystoseira* Facies in the Aegean Coast of Turkey. *Turk. J. Zool.* 2004; 28: 309-316.
- Kykkidou S, Giatrakou V, Papavergou A, Kontominas M.G and Savvaıdis IN.** Effect of thyme essential oil and packaging treatments on fresh Mediterranean swordfish fillets during storage at 4°C. *Food Chemistry.* 2009;115 (1): 169-175.
- Lambert RJW, Skandamis PN, Coote P and Nychas GE.** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology.* 2001; (91): 453–462p.
- Lee SY and Jin HH.** Inhibitory activity of natural antimicrobial compounds alone or in combination with nisin against *Enterobacter sakazakii*. *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology.* 2008; (47) :315–321.
- Lean LP and Suhaila M.** Antioxidative and Antimycotic effect of turmeric, lemon-grass, Betel leaves, Clove, Black Papper Leaves and *Garcinia Atriviridis* on butter cakes. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 1999; 79 (13): 1817-1822.
- Mastromatteo M.** Alessandra Danza., Amalia Conte., Giuseppeuratore and Matteo Alessandro Del Nobile. Shelf life of ready to use peeled shrimps as affected by thymol essential oil and modified atmosphere packaging. *International Journal, of, Food Microbiology.* 2010; (144): 250-256.
- Matches O.R.** Effects of temperature on the decomposition of pacific coast shrimp (*Pandalus jordan*). *J. of Food Sci.* 1982; 47:1044-1047.
- Neuman R, Molar P, and Arnold S.** Sensorische Lebensmitteluntersuchung. Veb Fachbuchverlag. Leipzig. 1985; 29 (2): pp 152
- Şentürk A.** Bazı Değerlendirilmiş Kabuklu Su ürünlerinin Mikrobiyolojik özellikleri üzerine Olan Faktörlerin Araştırılması. T.C.Tarım Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü. Genel Yayın No:20. Ankara, 1994.
- Santos L.D, James C and Teutscher F.** Guidelines for, Chilled, Fish, Storage Experiments. FAO Fisheries Technical Paper. 1981; 210p.
- Shamshad SI, Kher-un-N, and Riaz M.** Shelf life of shrimp (*Penaeus merguensis*) stored at different temperatures (Document). *Journal of Food Science.* 1990a; 55 (5) 1201-1205.
- Shamshad SI, Nisa KU, Riaz M, Zuberi R and Quarri RB.** Shelf Life of Shrimp (*Penaeus merguensis*) Stored at Different Temperatures. *Journal of Food Science.* 1990b; 55: 1201-1205.
- Stockemer J and Nieper L.** Parameter zur Beurteilung der Verderbs von Nordsee-Krabben (*Crangon crangon*). *Archiv für Lebensmittel hygiene.* 1984; (35): 1- 24
- Ünlüsayın M. ve Gülyavuz H.** Su Ürünleri İşleme Teknolojisi. Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Ders Kitabı. Antalya. 2008.
- Varlık C, Uğur M, Gökoğlu N ve Gün H.** Su Ürünlerinde Kalite Kontrol İlke ve Yöntemleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No: 17. İstanbul. 1993a.; 174s.
- Varlık C ve Gökoğlu N.** Dondurulmuş karideslerin (*Penaeus Longirostris*. 1845) Depolanması. E.U. Su Ürünleri Fak. Su Ürünleri Dergisi. 1993b;10: 71-81.
- Varlık C, Baygar T, Özden Ö. Erkan N ve Metin S.** Soğukta Depolanan Karideslerin (*Parapenaeus longirostris*, LUCAS 1846) Bazı Duygusal, Fiziksel ve Kimyasal Parametrelerinin Belirlenmesi. *Turk J Vet Anim Sci.* 2000; 24: 181–185.

Sıçanlarda Akrilamid ile İndüklenen Oksidatif Strese Karşı Taurinin Koruyucu Etkisi[#]

Sinan İNCE^{1*}, Ulaş ACARÖZ², Damla ARSLAN ACARÖZ³, Nuray VAROL⁴, Zeki GÜRLER², İsmail KÜÇÜKKURT⁵, Hasan Hüseyin DEMİREL³, Abdullah ERYAVUZ⁶

¹Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, Türkiye

²Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, Türkiye

³Afyon Kocatepe Üniversitesi, Bayat Meslek Yüksek Okulu, Laborant ve Veteriner Sağlık Bölümü, Afyonkarahisar, Türkiye

⁴Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, Türkiye

⁵Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, Türkiye

⁶Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, Türkiye

[#]Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 16.KARİYER.55 proje numarası ile desteklenmiştir. Ayrıca, bu çalışmanın bir bölümü 4th International VET-Istanbul Group Congress Almaty-KAZAKİSTAN'da bildiri olarak sunulmuştur.

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

ÖZ

Bu çalışmada, sıçanlarda akrilamid ile oluşturulan oksidatif strese karşı antioksidan ajan olan taurinin koruyucu etkisinin araştırılması amaçlandı. Toplam 35 Wistar erkek sıçan standart rodent yemiyle beslendi ve 5 eşit gruba ayrıldı. I. Grup: kontrol grubu, II. Grup: sadece 15 mg/kg akrilamid 60 gün boyunca gastrik gavaj yolu ile verildi. III., IV. ve V. gruplara sırasıyla akrilamid (15 mg/kg) ve taurin 50, 100 ve 200 mg/kg/gün olacak şekilde ağızdan gastrik gavaj ile verildi. Akrilamid uygulaması sıçanların kan ve dokularında malondialdehid seviyelerinde önemli bir artışa ve glutasyon seviyelerinde azalmaya neden oldu. Buna ilave olarak, akrilamid uygulaması ile süperoksid dismutaz ve katalaz aktivitelerinin sıçan eritrosit ve dokularında azaldığı belirlendi. Taurin uygulamasının akrilamid ile indüklenen oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu azaltarak vücudun antioksidan savunma sistemini iyileştirdiği belirlendi. Bunun yanı sıra, taurin uygulaması ile akrilamid verilen sıçanların karaciğer ve beyin dokularındaki IFN- γ , IL-1 β , TNF- α ve NF κ B mRNA ekspresyon düzeylerinin azaldığı gözlemlendi. Ayrıca, taurin dokularda akrilamid ile indüklenen oksidatif stres sonucu oluşan histopatolojik değişikliklere karşı koruyucu etki gösterdi. Sonuçta doza bağlı olarak taurinin sıçanlarda antioksidan savunma mekanizmasını artırarak akrilamidle indüklenen oksidatif strese karşı koruyucu etki gösterdiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Akrilamid, taurin, sıçan, oksidatif stres, lipid peroksidasyon, sitokin.

Protective Effect of Taurine Against Acrylamide-induced Oxidative Stress in Rats

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the protective effect of taurine on acrylamide-induced oxidative stress in rats. Totally, 35 Wistar albino male rats were fed standard rodent diet and divided into 5 equal groups. I. Group: control group, II. Group: only 15 mg/kg acrylamide treated by gastric gavage for 60 days. III., IV., and V. group received 15 mg/kg acrylamide with taurine at dose of 50, 100 and 200 mg/kg/day by gastric gavage. Treatment with acrylamide significantly increased malondialdehyde levels and decreased glutathione levels in blood and tissues of rats. Additionally, acrylamide treatment decreased superoxide dismutase and catalase activities in erythrocyte and tissues of rats. However, treatment of taurine inhibited acrylamide-induced oxidative stress, lipid peroxidation, and enhanced the antioxidant enzymes activities. Besides, mRNA expression levels of IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , and NF κ B in liver and brain of acrylamide exposed rats were decreased with taurine treatment. Moreover, taurine exhibited protective action against the acrylamide-induced histopathological changes in tissues. In conclusion, it was determined that taurine in a dose-dependent manner has a protective effect against acrylamide induced oxidative stress by increasing antioxidant defense mechanism in rats.

Keywords: Acrylamide, taurine, rat, oxidative stress, lipid peroxidation, cytokine.

To cite this article: İnce S. Acaröz U. Arslan Acaröz D. Varol N. Gürler Z. Küçük Kurt İ. Demirel H.H. Eryavuz A. Sıçanlarda Akrilamid ile İndüklenen Oksidatif Strese Karşı Taurinin Koruyucu Etkisi. Kocatepe Vet J. (2018) 11(4): 479-490.

GİRİŞ

Son yıllarda yapılan çalışmalar, serbest oksijen radikallerin nörolojik hastalıklar, astım, kanser, diabetes mellitus, romatoid artrit gibi birçok hastalığın patogeneğinde rol aldığını göstermektedir. Bununla birlikte, radyasyon maruziyeti, insektisidler, ağır metaller, zehirli gaz partikülleri ve bazı farmakolojik ilaçlar gibi faktörlerin bu hastalıklarla bağlantılı olduğu belirtilmektedir (Engin ve ark. 2003, Mercan 2004). Akrilamid, yapısında vinil grubu bulunan, suda çözünür ve poliakrilamid sentezinde kullanılan bir monomerdur. Kağıt, boya, kozmetik sanayinde akrilamid sıkça kullanılmaktadır (Saulo 2003). Hayvanlar üzerinde yapılan deneyler akrilamidin başlıca sinir sisteminde, aşırı miktarlarda ise kaslar ve hormonal bezler üzerinde hasar yaptığını göstermiştir (Doğan ve Meral, 2006). Yüksek sıcaklık uygulanan ve fazla miktarda nişasta içeren gıdaların önemli miktarlarda akrilamid içerdiği ve bunun sonucunda genotoksik ve nörotoksik etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Zhang ve ark. 2005). Patates cipsi ve kızartması ile ekmek ve işlenmiş tahılların özellikle akrilamid miktarı bakımından önem arz ettiği bildirilmektedir. Yüksek sıcaklık uygulanan gıdalarda akrilamid oluşumunun aminoasitler (başta asparajin) ve reaktif karbonil içeren indirgen şekerler arasında gerçekleşen Maillard reaksiyonundan kaynaklandığı belirtilmektedir (Amrein ve ark. 2005, Claeys ve ark. 2005).

Taurin (2-aminoetan sülfonik asit), protein sentezinde kullanılmayan birkaç aminoasitten biridir ve esansiyel olmayan aminoasit olarak da tanımlanmaktadır. Vücutta yaygın bir dağılıma sahiptir, bu da organizmada birçok görevi olduğunu göstermektedir. Taurinin biyolojik aktiviteleri arasında yer alan antioksidan kapasitesi ile ilgili çalışmalarda hücre koruyucu ve hücre ölümünü azaltıcı olarak hayati öneme sahip olduğu gözlenmiştir (Das ve Sil, 2012, Perfetio ve ark. 2012). Bununla birlikte taurin elektron transport zincirini stabilize ederek mitokondriyal fonksiyonları güçlendirmektedir ve reaktif oksijen türlerinin üretimini inhibe etmektedir (Jong ve ark. 2012). Taurin eksikliğinde kardiyomyopati, renal disfonksiyonlar, pankreatik β hücrelerinde disfonksiyonlar ve retinal fotoreseptörlerde kayıp gibi patolojik durumlar meydana gelmektedir (Zulli 2011). Taurinin hücre düzeyindeki etkileri, kardiyovasküler ve merkezi sinir sistemleri gibi çeşitli doku ve organlardaki işlevleriyle kendini gösterir. Ayrıca, diyabet komplikasyonları, hepatotoksisite, iskem/reperfüzyon hasarıyla ilişkili klinik durumlarda gösterdiği etkileri antioksidan özelliğiyle ilişkilendirilmektedir. Vücutta beyin, kas, kemik dokusu ve kan hücrelerinde bol miktarda bulunmaktadır. Çeşitli hücre kültürü çalışmalarıyla,

taurinin osteoblastlar üzerinde uyarıcı ve osteoklastogenezisi baskılayıcı etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalar ışığında, taurinin normal kemik metabolizması üzerinde de etkisi olduğu düşünülmektedir (Yuan ve ark. 2010).

Bu çalışmada akrilamid ile kronik toksisiteye maruz bırakılan Wistar erkek sıçanlarda taurinin koruyucu etkisinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla; kan ve doku malondialdehid (MDA), glutatyon (GSH), katalaz (CAT) ve süperoksid dismutaz (SOD) aktiviteleri belirlendi. Buna ilaveten, karaciğer, böbrek, beyin, akciğer ve kalp dokuları ışık mikroskopuyla histopatolojik olarak ve karaciğer ile beyin dokularında IFN- γ , IL-1 β , TNF- α ve NF κ B genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri Real-Time PCR yöntemi ile incelendi.

MATERYAL ve METOT

Taurin Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Amerika)'ten ve akrilamid Merck (Darmstadt, Almanya)'ten temin edildi. Diğer tüm kimyasal ve ayrıştırıcıların hepsi analitik saflıkta ticari firmalardan alındı.

Deneysel Protokol

60 günlük ve 250-300 g ağırlığındaki sağlıklı erkek Wistar albino sıçanlar Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden (Afyonkarahisar/Türkiye) temin edildi. Hayvanlar oda sıcaklığında (25 °C) bağıl nemde (% 50-55), yeteri kadar standart rodent yemi ve suyla, 12 saat karanlık/aydınlık periyotlarla tutuldu. Standart rodent yemi ve suyu sıçanlara *ad libitum* verildi. Sıçanların deney uygulamasına başlanmadan önce en az 7 gün boyunca ortama uyumları sağlandı. Hayvanlar her grupta 7'şerli olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Toplamda 35 Wistar erkek sıçan kullanıldı. Çalışmada kullanılan akrilamid ve taurin dozları için önceden yapılmış çalışmalardan yararlanıldı (Das ve ark. 2009, Patel ve ark. 2015). Deneysel aşama 60 gün olarak ve deney grupları aşağıda belirtildiği şekilde yapıldı.

Grup 1 (Kontrol); Kontrol grubuna, standart rodent yemi ve temiz içme suyu verildi.

Grup 2 (Akrilamid); Akrilamid grubundaki sıçanlara 15 mg/kg akrilamid gastrik gavaj ile verildi.

Grup 3 (I₅₀₊ akrilamid); sıçanlara 15 mg/kg dozunda akrilamid ve 50 mg/kg taurin (I) gastrik gavajla verildi.

Grup 4 (I₁₀₀₊ akrilamid); sıçanlara 15 mg/kg dozunda akrilamid ve 100 mg/kg taurin (I) gastrik gavajla verildi.

Grup 5 (I₂₀₀₊ akrilamid); sıçanlara 15 mg/kg dozunda akrilamid ve 200 mg/kg taurin (I) gastrik gavajla verildi.

Ayrıca, bu çalışmanın yapılması için Afyon Kocatepe Üniversitesi Etik Kurul'undan 49533702-46 referans numarası ile onay alındı.

Kan Toplama

Çalışmanın sonunda her bir gruptaki hayvandan ksilazin-ketamin anestezi altında intrakardiyak olarak heparinli tüplere kan örnekleri alındı.

Eritrositlerin Hazırlanması

Toplanan kan örnekleri 30 dk içerisinde 4 °C'de 15 dk 600 g'de santrifüj edilerek plazma örnekleri elde edildi. Eritrositler izotonik solüsyonda 3 kere yıkandı ve beyaz kısmı atıldı. Daha sonra aynı miktarda izotonik solüsyon ile eritrositlerin üzerine eklendi ve -20 °C'de buzdolabında muhafaza edildi. Kullanılacak eritrosit süspansiyonları 5 katı hacminde deiyonize su kullanılarak parçalandı. Eritrosit lizatı 3 gün içerisinde ölçülene kadar 4 °C'de saklandı (Winterbourn ve ark. 1975).

Homojenatların Hazırlanması

Hayvanlardan alınan karaciğer, böbrek, beyin, akciğer ve kalp dokuları NaCl (% 0.9' luk) ile iyice yıkandı. Dokuların kesilmesi işlemi dondurulmuş 0.15 M Tris-HCl tampon solüsyonu (pH 7.4) içinde yapıldı. Kesim işlemi sonrası dokular 0.15 M Tris-HCl tampon solüsyonunda (pH 7.4)'da homojenize edildi. Dokular 4 °C'de 2500 g'de 10 dk santrifüj edildi ve elde edilen süpernatantlar ise -20 °C'de analiz edilinceye kadar saklandı (Kucukkurt ve ark. 2008).

Histopatolojik Analizler için Dokuların Hazırlanması

Çalışmanın sonunda, histopatolojik analiz için sıçanlardan karaciğer, böbrek, beyin, akciğer, kalp ve testis dokuları % 10'luk formalin solüsyonu içine alındı ve bu solüsyonda 48 saat süre ile tutuldu. Dokular % 70-100 dereceli alkolden geçirilerek dehidre edildi ve ksilen ile temizlendikten sonra parafine gömülme işlemi yapıldı. Dokulardan 5-6 µm'lik kesitler alındı ve sonrasında kesitler hemotoksilen-eosinle (H&E) ile boyandı. Değerlendirme amacıyla dokular ışık mikroskobu altında Olympus BX51 ve DP20 eklenilmiş Mikroskopik Dijital Resim Analiz Sistemi (Tokyo, Japonya) ile incelendi.

Tam Kan ve Doku Homojenatlarında Malondialdehid ve Glutatyon Ölçümü

Lipid peroksidasyon (LPO) için önemli bir belirteç olan MDA, tam kanda Draper ve Hardley (1990), doku homojenatlarında ise Ohkawa ve ark. (1979)'nin metoduyla belirlendi. Metotların prensibi MDA ile tiyobarbitürik asit (TBA)'in reaksiyonu sonucu ortaya çıkan rengin spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır. Analiz sonunda elde edilen bu rengin absorbansı spektrofotometrik olarak 532 nm dalga boyunda ölçüldü. MDA

konsantrasyonu, MDA-TBA kompleksinin absorbans katsayısıyla hesaplandı ve kanda nmol/ml veya dokuda nmol/g olarak ifade edildi. GSH konsantrasyonu tam kan ve doku homojenatlarında Beutler ve ark. (1993) tarafından tanımlanan metot kullanılarak ölçüldü. Kısaca, 0.2 ml örnek üzerine 1.8 ml distile su eklendi. 3 ml presipitasyon solüsyonu (1.67 g metafosforik asit, 0.2 g EDTA ve 30 g NaCl 100 ml distile suda çözülürdü) numune ile karıştırıldı. Karışım yaklaşık 5 dk bekletildikten sonra filtre edildi (Whatman No.42). Filtrattan 2 ml alındı ve daha sonra başka bir tüpe alınıp 8 ml fosfat solüsyonu (0.3 M disodyum hidrojen fosfat) ve 1 ml 5, 5'-Dithio-bis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) eklendi. Kör için 2 ml dilüe presipitasyon solüsyonu, 8 ml fosfat solüsyonu ve 1 ml DTNB reaktif solüsyonu eklendi. GSH standart standart solüsyonu (40 mg/100 ml) hazırlandı. Optik dansite spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda ölçüldü. Sonuçlar kanda nmol/ml veya dokuda nmol/g olarak ifade edildi.

Eritrosit Lizatında ve Doku Homojenatında süperoksid dismutaz ve katalaz Aktivitesinin Ölçümü

Eritrosit lizatında ve doku homojenatında SOD'un antioksidan enzim aktivitesi Sun ve ark. (1988)'nin metoduna göre ölçüldü. Süperoksid radikallerinin ortamda bulunan nitroblue tetrazolyumu mavi renkli formazona indirgemesiyle elde edilen absorbans spektrofotometrik olarak 560 nm dalga boyunda belirlendi. SOD aktivitesi eritrosit için U/mgHb veya dokudaki protein için U/µg olarak ifade edildi. Eritrosit lizatında ve doku homojenatında CAT aktivitesi sırasıyla Luck (1955) ve Aebi (1974)'nin metoduna göre belirlendi. Bu metotlar H₂O₂'nin katalaz tarafından parçalanmasına dayanır. Reaksiyon karışımı pH 7.0 olan, 50 mM fosfat tamponu; 10 mM H₂O₂ ve numuneyi içerir. H₂O₂'nin indirgenme hızı oda ısısında, 240 nm de 45 saniye süresince izlendi. Bir birim CAT miktarı, 25 °C'de pH 4.5'de her bir dakikada 1 µmol H₂O₂'i parçalayan enzim miktarına karşılık gelir. CAT aktivitesi eritrosit için nmol dk⁻¹/mgHb veya dokudaki protein için nmol dk⁻¹/µg olarak ifade edildi. Hemoglobin (Hb) Drabkin ve Austin (1935)'e göre siyanomethemoglobin metoduyla kolorimetrik olarak belirlendi. Dokudaki protein içeriği ise Lowry ve ark. (1951)'nin kolorimetrik metoduna göre test edildi. Spektrofotometrik ölçümler Shimadzu 1601 UV-VIS spektrofotometresi (Tokyo, Japonya) kullanılarak gerçekleştirildi.

Genlerin ekspresyonlarının Real-Time PCR ile belirlenmesi

IFN-γ, IL-1β, TNF-α ve NFκB genlerinin mRNA miktarları, Real-Time PCR yöntemi ile RotorGeneQ cihazı kullanılarak yapıldı.

Amplifikasyonlar 25 µl toplam tepkime hacmi içerisinde; cDNA, hedef bölgeye özgü primerler (Tablo 1) ve RT² SYBR Green Mastermix karışımı (Qiagen, Almanya; Kat. No:330500) ile steril H₂O-PCR grade kullanılarak gerçekleştirildi. IFN-γ, IL-1β, TNF-α ve NFκB genlerinin ifadenmesini normalize etmek için GAPDH mRNA düzeyi referans olarak alındı.

İstatistiksel Analiz

Araştırmadan elde edilen sonuçlara SPSS 20.0 istatistik paket programında tek yönlü varyans (one way ANOVA) testi uygulandı. İstatistiksel fark bulunan sonuçlara Duncan post-hoc testi uygulandı. Veriler "ortalama ± standart sapma" olarak ifade edildi. İstatistiksel anlamlılık için p<0.05 kabul edildi.

BULGULAR

Lipid Peroksidasyon ve İndirgenmiş Glutasyon Üzerine Etkisi

MDA düzeyi, serbest radikal aracılı LPO'nun belirteci olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Akrilamid uygulanan sıçanlar kontrolle kıyaslandığında tam kan, böbrek, karaciğer, kalp, beyin, testis ve akciğer MDA düzeylerinde belirgin bir artış gözlemlendi (p<0.05). Buna karşın, taurin verilen (artan dozuna bağlı olarak) akrilamid gruplarında (Tablo 2) tam kan ve dokularda MDA düzeylerinin azaldığı belirlendi (p<0.05). GSH, detoksifikasyonda enzimatik olmayan bir antioksidan madde olup, ksenobiyotik metabolitlerinin toksik etkisini azaltmaktadır. Akrilamid gruplarında tam kan, böbrek, karaciğer, kalp, beyin, testis ve akciğer GSH düzeyleri kontrol grubundan daha düşük bulundu (p<0.05). Buna karşın, doza bağlı olarak taurin gruplarında tam kan ve dokuların GSH düzeyleri akrilamid grubundan daha yüksek bulundu (Tablo 3).

Antioksidan Enzimlere Etkisi

Antioksidan enzimlerden SOD ve CAT aktiviteleri sıçanların eritrositlerinde, böbrek, karaciğer, kalp, beyin, testis ve akciğer dokularında Tablo 4 ve 5'te gösterildiği gibi belirlendi. Akrilamid grubu

kontrolle kıyaslandığında, SOD ve CAT aktiviteleri eritrosit, böbrek, karaciğer, kalp, beyin, testis ve akciğer dokularında düşük bulundu (p<0.05). Buna karşın, artan miktarlarda taurin uygulamasının, akrilamid ile indüklenen SOD ve CAT aktivite değişikliklerini kontrol grubunda elde edilen verilere doğru yaklaştırdığı gözlemlendi (p<0.05).

İnflamasyon genleri üzerine etkisi

İnflamasyon genlerinin üzerine olumsuz etkisi bilinen akrilamidin karaciğer (Şekil 1) ve böbrek (Şekil 2) dokularında IFN-γ, IL-1β, TNF-α, ve NFκB'nin mRNA ekspresyon düzeylerini arttırdığı belirlendi (p<0.001). Buna karşın akrilamid ile birlikte uygulanan taurin uygulamasının artan dozuna bağlı olarak bu değerleri azalttığı tespit edildi (p<0.001).

Histopatolojik Değişiklikler

Deney gruplarındaki hayvanlara ait organlarındaki histopatolojik değişiklikler ayrıntılı olarak tanımlanmış ve Şekil 3'de gösterilmiştir. Akrilamid grubundaki hayvanların beyin dokularında neuronal dejenerasyon ile fokal gliozis (Şekil 3A2), akciğerlerinde interalveolar septal dokuda kalınlaşma ve alveoller içerisinde ödem oluşumu (Şekil 3B2), kalp dokularında hyalin dejenerasyonları (Şekil 3C2), karaciğerlerinde sinüzoidal dilatasyon ve hiperemi ile Kupffer hücre sayısında artış (Şekil 3D2), böbrek glomeruluslarında hiperemi ile tubulus epitel hücrelerinde dejeneratif değişiklikler (Şekil 3E2) ve testis dokularında tubulus semineforus contortus lumenine dökülmüş hücreler ve yeni şekillenmeye başlamış dev hücre oluşumları ile spermatozoit yoğunluğunda azalma (Şekil 3F2) gözlemlendi.

Akrilamid ve taurin verilen gruplarda, beyin, akciğer, kalp, karaciğer, böbrek ve testis dokularında akrilamid grubuna kıyasla daha az histopatolojik değişim gözlemlendi (Şekil 3A-F,3,4,5, sırasıyla). Kontrol grubunda, sıçanların beyin, akciğer, kalp, karaciğer ve böbrek dokularında önemli histopatolojik değişimler gözlemlenmedi (Şekil 3A-F1, sırasıyla).

Tablo 1. Hedef genlere ait primer dizileri, band uzunluğu ve referans pozisyonu

Table 1. Primers sequences, band length, and reference position of target genes

Gen Adı	Primer dizisi	Band Uzunluğu	Referans Pozisyonu*
IFN-γ	F: 5'-CACGCCGCGTCTTGGT-3', R: TCTAGGCTTTCAAT-GAGTGTGCC	71	275
IL-1β	F: 5'-CACCTCTCAAGCAGACACAG-3', R: GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC	77	820
TNF-α	F: 5'-CTTCTGTCTACTGAACCTTCGG-3', R: GTGCTTGATCTGT-TGTTTCC	86	262
NFκB	F:5'-GGGACTATGACTTGAATGCGGTCC-3', R: CAGGTCCCCTGAAAATACACCTCAA	156	2265
GAPDH	F: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', R: TCCACCACCTGTTGCTGTA	200	1086

*RefSeq sekansındaki amplikon pozisyonu.

Tablo 2. Erkek sıçanlarda tam kan ve doku MDA düzeyleri üzerine 15 mg/kg dozunda akrilamid ve 15 mg/kg akrilamid + 50 (T₅₀), 100 (T₁₀₀) ve 200 (T₂₀₀) mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) etkisi

Table 2. Effects of 15 mg/kg acrylamide and 15 mg/kg acrylamide plus 50 (T₅₀), 100 (T₁₀₀), and 200 (T₂₀₀) mg/kg taurine (T) on MDA levels in blood and tissues of male rats.

Gruplar	Kan (nmol/ml)	Böbrek (nmol/g doku)	Karaciğer (nmol/g doku)	Kalp (nmol/g doku)	Beyin (nmol/g doku)	Testis (nmol/g doku)	Akciğer (nmol/g doku)
Kontrol	3.90±0.74 ^c	2.82±0.62 ^c	2.99±1.40 ^b	0.54±0.16 ^b	2.67±0.61 ^b	1.28±0.27 ^c	1.82±0.46 ^b
Akrilamid	5.97±0.81 ^a	5.99±0.91 ^a	5.66±1.46 ^a	0.92±0.27 ^a	4.54±0.73 ^a	2.96±0.88 ^a	2.48±0.65 ^a
Akrilamid+T₅₀	5.43±1.51 ^{ab}	4.33±0.59 ^b	4.08±1.41 ^{ab}	0.83±0.22 ^a	3.29±0.55 ^b	1.97±0.51 ^b	2.17±0.58 ^{ab}
Akrilamid+T₁₀₀	4.51±1.01 ^{bc}	3.42±0.54 ^c	4.06±1.77 ^b	0.68±0.19 ^{ab}	3.20±0.31 ^b	1.50±0.56 ^{bc}	1.85±0.28 ^b
Akrilamid+T₂₀₀	4.27±0.47 ^c	3.15±0.51 ^c	3.05±0.82 ^b	0.68±0.25 ^{ab}	2.92±0.56 ^b	1.61±0.46 ^{bc}	1.89±0.47 ^b

Ortalama ± standard sapma; n=7

^{a,b,c} Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir

Tablo 3. Erkek sıçanlarda tam kan ve doku GSH düzeyleri üzerine 15 mg/kg dozunda akrilamid ve 15 mg/kg akrilamid + 50 (T₅₀), 100 (T₁₀₀) ve 200 (T₂₀₀) mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) etkisi

Table 3. Effects of 15 mg/kg acrylamide and 15 mg/kg acrylamide plus 50 (T₅₀), 100 (T₁₀₀), and 200 (T₂₀₀) mg/kg taurine (T) on GSH levels in blood and tissues of male rats.

Gruplar	Kan (nmol/ml)	Böbrek (nmol/g doku)	Karaciğer (nmol/g doku)	Kalp (nmol/g doku)	Beyin (nmol/g doku)	Testis (nmol/g doku)	Akciğer (nmol/g doku)
Kontrol	44.00±6.33 ^a	21.78±4.58 ^a	24.14±4.35 ^a	12.53±1.99 ^a	16.80±2.31 ^a	19.38±1.92 ^a	17.63±2.28 ^a
Akrilamid	32.00±9.33 ^b	9.03±0.86 ^c	16.08±3.02 ^b	8.50±0.81 ^c	11.96±1.17 ^d	13.41±1.17 ^c	11.30±1.53 ^b
Akrilamid+T₅₀	32.95±6.03 ^b	10.36±2.31 ^{bc}	19.17±4.85 ^{ab}	9.41±1.11 ^{bc}	13.22±1.13 ^{cd}	13.98±1.73 ^c	12.14±2.11 ^b
Akrilamid+T₁₀₀	36.34±9.30 ^{ab}	11.16±3.31 ^{bc}	19.69±5.63 ^{ab}	9.70±1.70 ^{bc}	14.48±1.52 ^{bc}	15.75±1.08 ^b	13.72±2.91 ^b
Akrilamid+T₂₀₀	43.24±9.64 ^a	13.27±3.98 ^b	22.84±5.66 ^a	10.37±1.71 ^b	16.08±3.17 ^{ab}	16.99±1.51 ^b	13.64±3.78 ^b

Ortalama ± standard sapma; n=7

^{a,b,c,d} Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir.

Tablo 4. Erkek sıçanlarda tam kan ve doku SOD düzeyleri üzerine 15 mg/kg dozunda akrilamid ve 15 mg/kg akrilamid + 50 (T₅₀), 100 (T₁₀₀) ve 200 (T₂₀₀) mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) etkisi

Table 4. Effects of 15 mg/kg acrylamide and 15 mg/kg acrylamide plus 50 (T₅₀), 100 (T₁₀₀), and 200 (T₂₀₀) mg/kg taurine (T) on SOD levels in blood and tissues of male rats.

Gruplar	Eritrosit (U/gHb)	Böbrek (U/μg protein)	Karaciğer (U/μg protein)	Kalp (U/μg protein)	Beyin (U/μg protein)	Testis (U/μg protein)	Akciğer (U/μg protein)
Kontrol	11.62±1.88 ^a	6.07±0.88 ^a	11.29±1.96 ^a	3.45±0.43 ^a	2.40±0.53 ^a	7.01±1.26 ^a	8.67±1.21 ^a
Akrilamid	7.65±1.68 ^c	3.03±0.34 ^c	5.76±1.09 ^c	2.35±0.49 ^c	0.64±0.35 ^c	4.58±1.18 ^c	6.25±1.17 ^b
Akrilamid+T₅₀	9.54±1.54 ^b	4.32±0.79 ^b	7.74±1.51 ^b	3.10±0.55 ^{ab}	1.63±0.15 ^b	5.53±1.11 ^{bc}	6.75±1.24 ^b
Akrilamid+T₁₀₀	9.71±1.50 ^b	5.40±0.64 ^a	6.28±0.62 ^{bc}	2.69±0.26 ^{bc}	1.71±0.58 ^b	6.42±1.02 ^{ab}	7.54±1.45 ^{ab}
Akrilamid+T₂₀₀	9.77±1.69 ^b	5.79±0.91 ^a	10.05±1.48 ^a	3.28±0.58 ^{ab}	2.03±0.36 ^{ab}	6.66±1.03 ^{ab}	7.34±1.28 ^{ab}

Ortalama ± standard sapma; n=7

^{a,b,c} Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir.

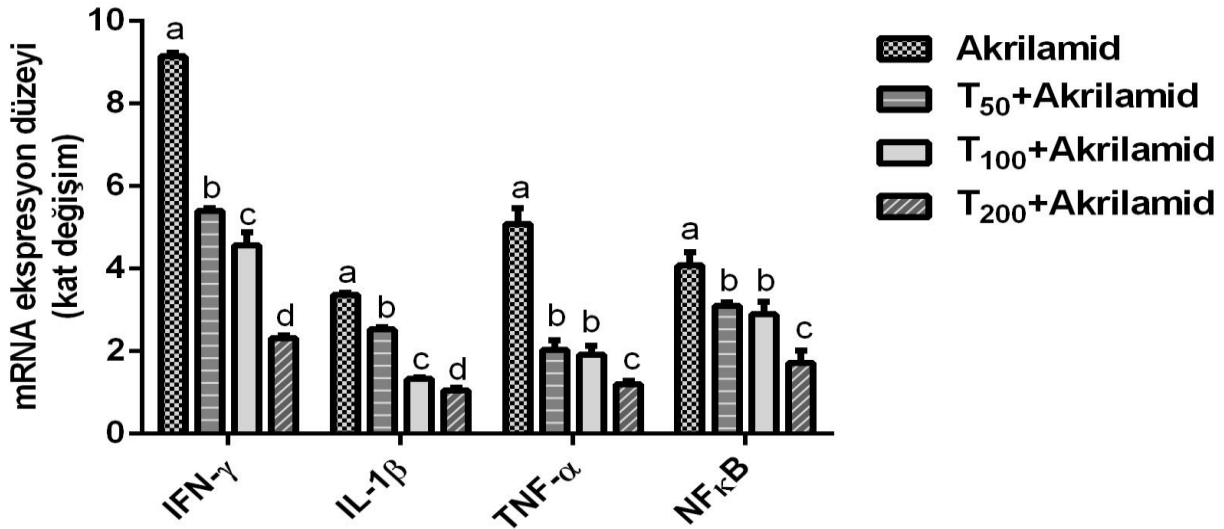
Tablo 5. Erkek sıçanlarda tam kan ve doku CAT düzeyleri üzerine 15 mg/kg dozunda akrilamid ve 15 mg/kg akrilamid + 50 (T₅₀), 100 (T₁₀₀) ve 200 (T₂₀₀) mg/kg miktarlarında uygulanan taurinin (T) etkisi

Table 5. Effects of 15 mg/kg acrylamide and 15 mg/kg acrylamide plus 50 (T₅₀), 100 (T₁₀₀), and 200 (T₂₀₀) mg/kg taurine (T) on CAT levels in blood and tissues of male rats.

Gruplar	Eritrosit (nmol dk ⁻¹ /gHb)	Böbrek (nmol dk ⁻¹ /μg protein)	Karaciğer (nmol dk ⁻¹ /μg protein)	Kalp (nmol dk ⁻¹ /μg protein)	Beyin (nmol dk ⁻¹ /μg protein)	Testis (nmol dk ⁻¹ /μg protein)	Akciğer (nmol dk ⁻¹ /μg protein)
Kontrol	11.93±2.48 ^a	8.17±1.45 ^a	13.73±1.16 ^a	6.55±1.10 ^a	7.38±0.53 ^a	10.18±1.39 ^a	5.78±0.91 ^a
Akrilamid	2.19±0.83 ^c	3.96±0.92 ^b	2.38±0.64 ^d	4.07±0.76 ^b	4.74±0.88 ^b	3.04±1.41 ^c	1.91±0.74 ^c
Akrilamid+T₅₀	2.64±0.77 ^c	4.17±0.46 ^b	4.26±0.84 ^c	4.47±0.87 ^b	4.78±0.94 ^b	3.06±1.61 ^c	2.59±0.57 ^c
Akrilamid+T₁₀₀	9.32±0.81 ^b	4.59±1.01 ^b	4.97±1.08 ^c	4.58±0.92 ^b	4.98±1.07 ^b	5.50±1.17 ^b	4.17±0.63 ^c
Akrilamid+T₂₀₀	11.42±1.47 ^b	7.60±0.99 ^a	6.47±0.80 ^a	6.25±0.95 ^a	6.65±0.93 ^a	9.16±1.88 ^a	5.50±0.78 ^a

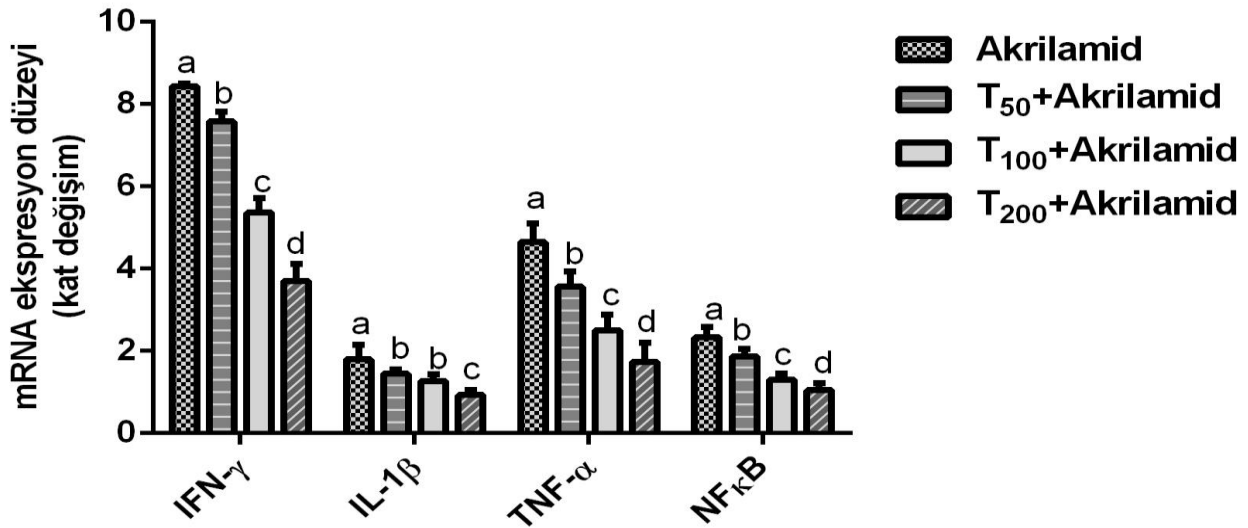
Ortalama ± standard sapma; n=7

^{a,b,c,d} Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir.



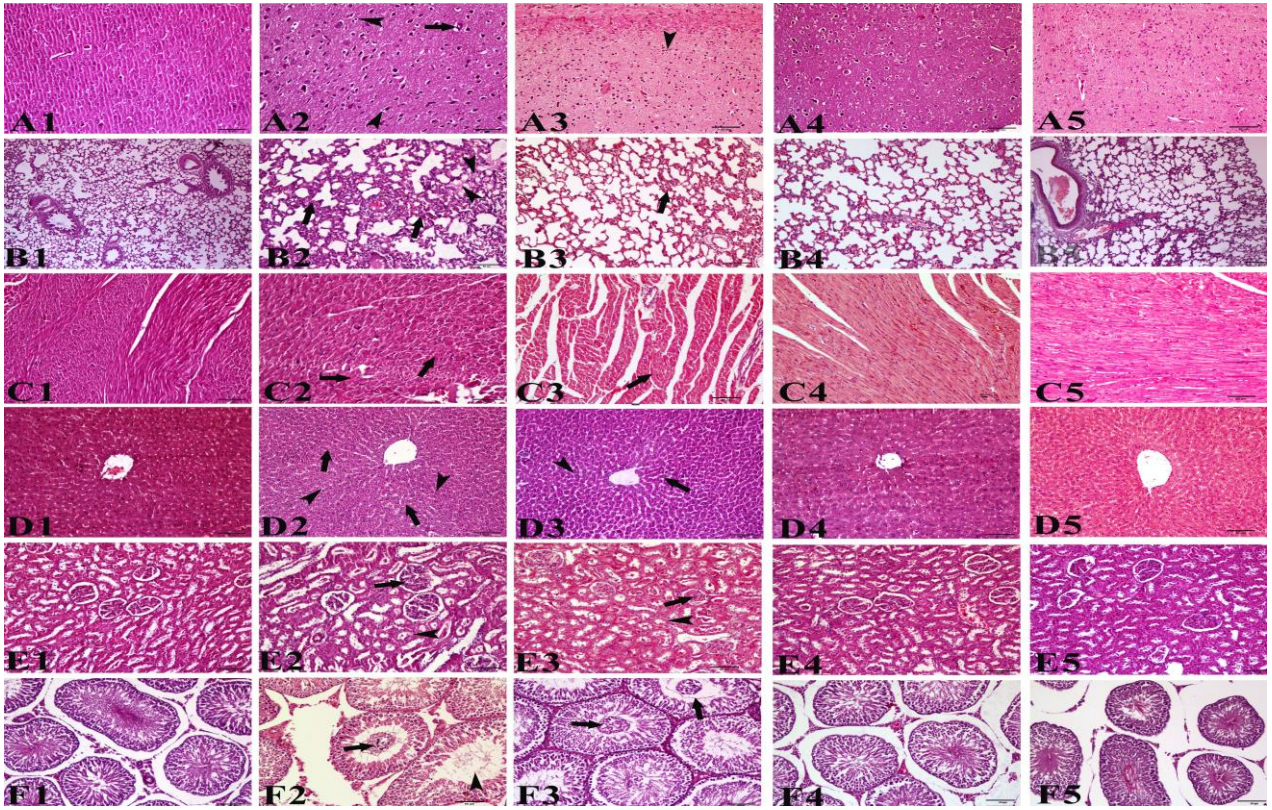
Şekil 1. Taurinin (T) 15 mg/kg akrilamid uygulanan sıçanların karaciğerindeki IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , ve NF κ B mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. Değerler ortalama \pm standard sapma şeklinde her grupta 7 doku olacak şekilde ifade edilmiştir. ^{a,b,c,d} farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir, $p < 0.001$.

Figure 1. The effect of taurine (T) on liver IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , ve NF κ B mRNA expression levels of rats treated with 15 mg/kg acrylamide. Values are expressed as the mean \pm SD of 7 tissues per group. ^{a,b,c,d} values with different letters are statistically significant, $p < 0.001$.



Şekil 2. Taurinin (T) 15 mg/kg akrilamid uygulanan sıçanların beyinlerindeki IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , ve NF κ B mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. Değerler ortalama \pm standard sapma şeklinde her grupta 7 doku olacak şekilde ifade edilmiştir. ^{a,b,c,d} farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir, $p < 0.001$.

Figure 2. The effect of taurine (T) on brain IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , ve NF κ B mRNA expression levels of rats treated with 15 mg/kg acrylamide. Values are expressed as the mean \pm SD of 7 tissues per group. ^{a,b,c,d} values with different letters are statistically significant, $p < 0.001$.



Şekil 3. Erkek sıçanların beyin (A), akciğer (B), kalp (C), karaciğer (D), böbrek (E) ve testis (F) dokularında akrilamid oluşturulan hasar üzerine taurinin (T) etkisi. Tüm şekiller H&E ile boyanmıştır. Orijinal büyütme oranı olarak 20x ve 100 µm kullanılmıştır. Ok ve ok başları sırasıyla beyinde neuronal dejenerasyon ile fokal gliozis (Şekil 3A2), akciğerlerde interalveolar septal dokuda kalınlaşma ve alveoller içerisinde ödem oluşumu (Şekil 3B2), kalp dokusunda hyalin dejenerasyonları (Şekil 3C2), karaciğerlerde sinüzoidal dilatasyon ve hiperemi ile Kupffer hücre sayısında artış (Şekil 3D2), böbrek glomeruluslarında hiperemi ile tubulus epitel hücrelerinde dejeneratif değişiklikler (Şekil 3E2) ve testiste tubulus seminiferus kontortus lumenine dökülmüş hücreler ve yeni şekillenmeye başlamış dev hücre oluşumları ile spermatozoit yoğunluğunda azalma (Şekil 3F2) işaret etmektedir. (1) Kontrol grubunu, (2) 15 mg/kg akrilamid uygulanan sıçanları (3) 50 mg/kg (4) 100 mg/kg ve (5) 200 mg/kg T ile birlikte 15 mg/kg akrilamid uygulanan sıçanları göstermektedir.

Figure 3. The effect of taurine (T) on acrylamide induced damage in brain (A), lung (B), heart (C), liver (D), kidney (E) and testis (F) of rats. Representative figures were stained with H&E. The original magnification was 20x and the scale bars represent 100 µm. Arrows and arrow heads indicate neuronal degenerations and focal gliosis in brain (Figure 3A2), interalveolar septal thickening and edema in alveols of lungs (Figure 3B2), hyaline degenerations in heart (Figure 3C2), sinusoidal dilatations, hyperemia and increase of Kupffer cells in liver (Figure 3D2), glomerular hyperemia and degenerations in tubulus epithelial cells of kidney (Figure 3E2) and spilled cells in tubulus seminiferous contortus, giant cell formations, and reduction in spermatozoa density in testis (Figure 3F2) of rats, respectively. (1) Control group, (2) animals treated with 15 mg/kg acrylamide, (3) 50 mg/kg (4) 100 mg/kg and (5) 200 mg/kg T plus 15 mg/kg acrylamide.

TARTIŞMA

Akrilamid oldukça yüksek kimyasal aktiviteye sahip α - β -ansature karbonil bileşiği olup, oldukça yaygın kullanıma sahiptir. Endüstriyel alanda yaygın kullanımının yanı sıra besinlerin pişirilmesi sırasında da oluşmaktadır. Gıda kaynaklı olan akrilamid insan sağlığı için tehlike arz etmektedir. Çünkü bu gıdalarla sürekli olarak vücuda alınmaktadır. Gıda kaynaklı akrilamid, karbonhidrat ve özellikle asparajin aminoasidi içeren gıdalarda, kızartma ve fırınlama işlemi sırasında 120 °C üzerine çıkan pişirme işlemi sırasında maillard reaksiyonu ile gerçekleşmektedir. Haşlama işlemi sırasında akrilamid oluşumu ile ilgili risk olmadığı

bildirilmiştir (Becalski ve ark. 2002, Tyl ve Crump 2003).

Oksidatif stres birçok biyolojik moleküle özellikle DNA'ya, proteinlere ve lipidlere zarar vermektedir. Bu hasar hücrelerde reaktif oksijen türleri tarafından meydana gelebilmektedir (Cai ve ark. 1997). ROS hücre membranındaki lipidlere okside olmasına yol açar ve membran bütünlüğü bozulur. Akrilamidin lipid peroksidasyon meydana getirdiğine ilişkin birçok çalışma bulunmaktadır (Yousef ve El-Demerdash 2006, Zhang ve ark. 2010, Allam ve ark. 2011, Hamdy ve ark. 2012, Zhang ve ark. 2012). Bununla birlikte bazı araştırmalarda akrilamidin insanlar için nörotoksik, deney hayvanları için nörotoksik ve kanserojen etki

gösterdiği belirtilmiştir (Rice 2005, Robert ve ark. 2010).

Yapılan bu çalışmada; oksidatif stresin yıkıcı etkilerini engellemek için antioksidan etkinliği bilinen taurinin akrilamidin yol açtığı oksidatif stres üzerine etkileri araştırıldı. Vücutta hiçbir proteinin yapısına girmeyen taurinin çok sayıda biyolojik işlevi vardır. Taurin ozmotik homeostazın ve kalsiyum homeostazının sağlanmasında düzenleyici role sahiptir. Lipidleri peroksidasyona karşı koruyarak membran stabilizasyonunu sağlamaktadır. Ayrıca, taurinin immünmodulator etkisi de bulunmaktadır. Bu etkisini inflamatuvar yanıtı düzenleyici rol oynayarak proinflamatuvar sitokin salınımını baskılaması ve enflamatuvar yanıtı düzenlemesi ile göstermektedir (Bouckennooghe ve ark. 2006, Wojtecka-Lukasik ve ark. 2006).

Yousef ve El-Demerdash (2006), ergin sıçanlara 0.5, 5, 25, 50, 250 ve 500 µg akrilamidi 10 hafta boyunca oral olarak uygulamışlar ve çalışma sonunda erkek sıçanların karaciğer, beyin, testis, akciğer ve böbrek dokularında hasarlar gözlemlemişlerdir. Ayrıca, LPO miktarının testiste 25 µg akrilamid uygulanmasından sonra arttığını belirlemişlerdir. Zhang ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada ise farelere 10 mg/kg akrilamidi 60 gün boyunca uygulamış ve deney sonucunda epididimdeki spermelerde LPO düzeyinin arttığını ve spermelerde SOD enzimi aktivitesinde azalma meydana geldiğini ifade etmişlerdir. Allam ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada sıçanlarda gebeliğin 7. gününden doğuma kadar ve gebeliğin 7. gününden laktasyon döneminin sonuna kadar 10 mg/kg akrilamidi anneye oral olarak uygulamış ve sonuçta gelişmekte olan beyinde LPO miktarının ve oksidatif stresin arttığını gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte gelişmekte olan beyin dokusunda SOD enzim aktivitesinde azalma olduğunu ifade etmişlerdir. Hamdy ve ark. (2012) sıçanlara sekiz hafta boyunca 5, 10 ve 15 mg/kg akrilamid uyguladıkları çalışmalarında, plazmada oluşan LPO miktarında artış saptamışlardır. Yapılan bir başka çalışmada Zhang ve ark. (2012) farelere 7 ve 14 gün boyunca 50 mg/kg akrilamidi intraperitoneal olarak uygulamışlar ve çalışma sonucunda testiste LPO miktarında artış belirlemişlerdir. Benzer şekilde, yapılan bu çalışmada da akrilamidin dokularda LPO düzeyini arttırdığı ve GSH düzeyini azalttığı tespit edildi. Koruyucu amaçla verilen taurinin ise antioksidan etkinliğini göstererek akrilamid ile artan LPO ve azalan GSH düzeylerini normale yaklaştırdığı gözlemlendi.

Akrilamidin katalaz enzimi üzerine etkilerinin incelendiği araştırmalarda; Zhang ve ark. (2010) farelere 10 mg/kg akrilamidi 60 gün boyunca oral olarak uygulamışlar ve çalışma sonunda CAT enzim aktivitesinde anlamlı bir fark tespit edememişlerdir.

2012 yılında yapılan başka bir çalışmada ise 4 ve 8 mg/kg akrilamid 60 gün boyunca sıçanların sularına karıştırılarak uygulanmış ve hayvanların testislerinde 8 mg/kg akrilamidin CAT düzeylerinde artış oluşturduğu belirtilmiştir (Camacho ve ark. 2012). Yousef ve El-Demerdash (2006) ergin sıçanlara 0.5, 5, 25, 50, 250 ve 500 µg miktarlarda akrilamidi 10 hafta boyunca oral olarak uyguladıkları çalışmalarında, 50 µg akrilamid uygulamasından sonra testiste SOD enzim miktarının arttığını belirlemişlerdir. Buna karşın, Zhang ve ark. (2012) yaptığı çalışmada, farelere 7 ve 14 gün boyunca 50 mg/kg akrilamidin intraperitoneal olarak uygulanması sonucunda, hayvanların testis dokularında SOD enzim aktivitesinde azalma tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise akrilamid uygulaması ile SOD ve CAT aktivitelerinin dokularda azaldığı, bununda artan oksidatif strese bağlı olarak dokularda SOD ve CAT'ın etkin rol oynayarak tükenme durumuna geldiği belirtilebilir. Buna ilaveten, akrilamid ile beraber verilen taurin gruplarında, SOD ve CAT enzim aktivitelerinin arttığı bununda taurinin (artan doza bağlı olarak) antioksidan etkisini göstererek oluşan oksidatif stresini inhibe ettiğini ve antioksidan enzim aktivitesini artırdığını göstermektedir.

İnflamasyon, kanser, diyabet, kardiyovasküler ve nörolojik hastalıklar başta olmak üzere birçok kronik hastalığın nedeni oksidatif stres ile ilişkilendirilmektedir. Bununla birlikte AP-1, NFκB, p53 gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerinin oksidatif stres durumunda aktive oldukları belirtilmektedir. (Ince ve ark. 2017). Yapılan birçok çalışmada, deney hayvanlarına (sıçan, fare) akrilamidin 20 mg/kg (Abdel-Daim ve ark. 2014), 40 mg/kg (Alturfan ve ark. 2012) ve 50 mg/kg (Zhang ve ark. 2013) gibi farklı dozlarda uygulanması sonucu inflamatuvar sitokinlerden IL-1β, IL-6 ve TNF-α'nın serum ve/veya plazma düzeylerinin önemli derecede arttığı belirtilmiştir. Bununla birlikte, antioksidan maddelerin (çemen yağı, resveratrol ve allisin) akrilamid ile birlikte uygulanmasının sonucunda bu düzeylerin normal seviyelerine yaklaştığı ifade edilmiştir. Acaröz ve ark. (2018) sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada karaciğer ve beyin dokusunda akrilamidin inflamatuvar sitokinlerin ekspresyon düzeylerinin (IF-γ, TNF-α, IL-1β, ve NFκB) artışına neden olduğunu, buna karşın artan dozda bor uygulamasının akrilamid ile artan ekspresyon düzeylerini baskıladığını bildirmişlerdir. Belirtilen çalışmalarla uyumlu olarak yapılan bu çalışmada da akrilamidin sıçanların karaciğer ve beyin dokularında IF-γ, IL-1β, TNF-α, ve NFκB ekspresyon düzeylerini arttırdığı, bu durumun aksine akrilamid ile birlikte verilen taurinin akrilamid uygulaması ile artan ekspresyon düzeylerini azalttığı belirlendi. Bu durum taurinin (artan dozuna bağlı olarak) antioksidan etkisini

göstererek oluşan inflamasyonu inhibe ettiğini göstermektedir.

Hammad ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada; akrilamidin artan dozlarına bağlı olarak dokularda şiddetli bozukluklara sebep olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarında sıçanların diyetine ilave edilen 10 mg/kg akrilamidin karaciğer hücrelerinde dejenerasyonlar oluşturduğunu, 30 mg/kg akrilamidin karaciğerde konjesyon ve sitoplazmik vakuolasyonlara, kalp damarlarında konjesyona, 90 mg/kg akrilamidin karaciğerde şiddetli dejenerasyonlara ve böbreklerde lenfosit infiltrasyona, dejenerasyona ve nekroza sebep olduğunu belirlemişlerdir. Fiedan ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada iki hafta boyunca 25 mg/kg akrilamid uygulamasının sıçanların testislerinde seminifer tubullerdeki spermatojenik hücrelerde konjesyon, intersitisyel ödem ve dejenerasyon ile dev spermatid hücreler, nekroz ve kalsifikasyon oluşumunu gözlemlemişlerdir. Totani ve ark. (2007) % 7 oranında akrilamid ihtiva eden yağ tüketen sıçanların karaciğerlerinde nekroz ve kanlanma ile böbreklerde kanlanma, hidrofik dejenerasyon ve glomeruluslarda daralmanın olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer şekilde yapılan bu çalışmada; akrilamidin beyin dokularında nöronal dejenerasyon ile fokal gliosis, akciğerlerde interalveolar septal dokuda kalınlaşma ve alveoller içerisinde ödem, kalp dokularında hyalin dejenerasyonları, karaciğerlerde sinüzoidal dilatasyon ve hiperemi ile Kupffer hücre sayısında artış, böbrek glomeruluslarında hiperemi ile tubulus epitel hücrelerinde dejeneratif değişiklikler ve testis dokularında tubulus seminiferus kontortus lumenine dökülmüş hücreler ve yeni şekillenmeye başlamış dev hücre oluşumları ile spermatozoit yoğunluğunda azalma meydana getirdiği tespit edilmiştir. Buna karşın, yapılan bu çalışmada antioksidan ve birçok farmakolojik etkinliğe sahip taurinin artan dozuna bağlı olarak beyin, karaciğer, böbrek, kalp, testis ve akciğer dokularını akrilamid ile oluşan hasara karşı koruduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak çalışmada, taurinin sıçanlarda akrilamid ile indüklenen oksidatif stres hasarına karşı koruyucu etkiye sahip olduğu belirlendi. Taurin bu gözlenen koruyucu etkilerini antioksidan aktivitenin artışıyla sağlayarak, LPO'yu engelleyerek ve inflamasyonu baskılayarak meydana getirmiştir. Aynı zamanda, taurin akrilamid ile oluşan doku hasarına karşı hücreleri korumakta ve rejenerasyonu artırmaktadır.

KAYNAKLAR

Abdel-Daim MM, Abd Eldaim MA, Hassan AG. Trigonella foenum-graecum ameliorates acrylamide-induced toxicity in rats: roles of oxidative stress, proinflammatory cytokines, and DNA damage. *Biochem Cell Biol.* 2014;

93 (3): 192–198.

- Acaroz U, Ince S, Arslan-Acaroz D, Gurler Z, Kucukkurt I, Demirel HH., Arslan HO, Varol N, Zhu, K.** The ameliorative effects of boron against acrylamide-induced oxidative stress, inflammatory response, and metabolic changes in rats. *Food Chem Toxicol.* 2018; 118:745-752.
- Aebi H.** Catalase in vitro, in: U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of enzymatic analysis.* Academic Press, New York and London. 1974; 673-677.
- Allam A, El-Ghareeb AA, Abdul-Hamid M, Baikry A, Sabri MI.** Prenatal and perinatal acrylamide disrupts the development of cerebellum in rat: Biochemical and morphological studies. *Toxicol Indust Health.* 2011; 27(4): 291-306.
- Alturfan AA, Tozan-Beceran A, Şehirli AÖ, Demiralp E, Şener G, Omurtag GZ.** Resveratrol ameliorates oxidative DNA damage and protects against acrylamide-induced oxidative stress in rats. *Mol Biol Rep.* 2012; 39 (4): 4589–4596.
- Amrein TM, Andres L, Schönbachler B, Conde-Petit B, Escher F, Amado R.** Acrylamide in almond products. *Europ Food Res Technol.* 2005; 221: 14-18.
- Becalski A, Lau BP, Lewis D, Seaman SW.** Acrylamide in foods; occurrence, source. Los Angeles CA. AOAC. Annual Meeting and EXPO, 2002; 22–26.
- Beutler E, Duron O, Kelly BM.** Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med.* 1993; 61: 882-888.
- Bouckenoghe T, Remacle C, Reusens B.** Is taurine a functional nutrient? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2006; 9(6): 728 - 733.
- Cai Q, Rahn Ro, Zhang R.** Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. *Cancer Lett.* 1997; 119(1): 99-107.
- Camacho L, Latendresse JR, Muskhelishvili L, Patton R, Bowyer JF, Thomas M, Doerge DR.** Effects of acrylamide exposure on serum hormones, gene expression, cell proliferation, and histopathology in male reproductive tissues of Fischer 344 rats. *Toxicol Lett.* 2012; 211: 135-143.
- Claeys WL, De Vleeschouwer K, Hendrickx ME.** Quantifying formation of carcinogens during food processing: acrylamide. *Trends Food Sci Tech.* 2005; 16:181-193.

- Das J, Sil PC.** Taurine ameliorates alloxan-induced diabetic renal injury, oxidative stress-related signaling pathways and apoptosis in rats. *Amino Acids.* 2012; 43: 1509-1523.
- Das, J, Ghosh, J, Manna P, Sinha M, Sil PC.** Taurine protects rat testes against NaAsO₂-induced oxidative stress and apoptosis via mitochondrial dependent and independent pathways. *Toxicol Lett.* 2009; 187(3): 201-210.
- Di Monte DA, Chan P, Sandy MS.** Glutathione in Parkinson's disease: a link between oxidative stress and mitochondrial damage? *Ann Neurol.* 1992; 32: 111-115.
- Doğan İS, Meral R.** Gıdalarda Akrilamid ve Önemi. Türkiye 9. Gıda Kongresi; 24-26 Mayıs 2006, Bolu.
- Drabkin DL, Austin JH.** Spectrophotometric studies. II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. *J Biol Chem.* 1935;112: 51-65.
- Draper HH, Hardley M.** Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 421-431.
- Fiedan IO, Ahmed EA, Omar HEDM.** Acrylamide induced testicular toxicity in rats: protective effect of garlic oil. *Biomarkers.* 2015; 1: 1-5.
- Engin A, Bozkurt BS, Altan N, Memiş L, Bukan N.** Nitric oxide-mediated liver injury in presence of experimental bile duct obstruction. *World J Surg.* 2003; 27(3): 253-255.
- Hamdy SM, Bakeer HM, Eskander EF, Sayed ON.** Effect of acrylamide on some hormones and endocrine tissues in male rats. *Human Experiment Toxicol.* 2012; 31 (5): 483-491.
- Hammad AY, Osman ME, Abdelgadir WS.** Histopathological Assessment and hematotoxicity of Dietary acrylamide on Wistar rats. *Int JLife Sci.* 2013; 7(1): 21-25.
- Ince S, Arslan-Acaroz D, Demirel HH, Varol N, Ozyurek HA, Zemheri F, Kucukkurt I.** Taurine alleviates malathion induced lipid peroxidation, oxidative stress, and proinflammatory cytokine gene expressions in rats. *Biomed Pharmacother.* 2017; 96: 263-268.
- Jong CJ, Azuma J, Schaffer S.** Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: prevention of mitochondrial oxidant production. *Amino Acids.* 2012; 42: 2223-32.
- Kucukkurt I, Ince S, Fidan AF, Ozdemir A.** The effects of dietary supplementation of different amount of *Yucca schidigera* powder (Sarsaponin 30®) on blood and tissue antioxidant defense systems and lipid peroxidation in rats. *J Anim Vet Advan.* 2008; 7: 1413-1417.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-75.
- Luck H.** Catalase. in: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods in Analysis.* Academy Press, London. 1955.
- Mercan U.** Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *Y Y Üniv Vet Fak Derg.* 2004; 15(1-2): 91-96.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K.** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95: 351-358.
- Patel PG, Kapadiya KB, Patel BJ.** Protective effect of vitamin E on biochemistry, oxidative stress and histopathological alterations induced by acrylamide in wistar rats (*Rattus norvegicus*). *Vet Sci Res J.* 2015; 6(1): 16-22.
- Perfeito R, Cunha-Oliveira T, Cristina Rego A.** Revisiting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson disease-resemblance to the effect of amphetamine drugs of abuse. *Free Rad Biol Med.* 2012; 53: 1791-1806.
- Rice JM.** The carcinogenicity of acrylamide. *Mutation Res.* 2005; 580: 3-20.
- Robert GT, Michael LG, Christopher R, Kirman M, Leigh Carson, Lisa MS.** Estimation of safe dietary intake levels of acrylamide for humans. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48: 658-667.
- Saulo AA.** Acrylamide in foods. *Food Safety Technol.* 2003: 1-2.
- Sun Y, Oberley LW, Li Y.** A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988; 34: 497-500.
- Totani N, Yawata M, Ojiri Y, Fujioka Y.** Effects of trace acrylamide intake in Wistar rats. *J Oleo Sci.* 2007; 56 (9): 501-6.
- Tyl R, Crump K.** Acrylamide in Food. *Food Standards Agency,* 2003; 5: 215-222.
- Winterbourn CC, Hawkins RE, Brain M, Carrell RW.** The estimation of red cell superoxide activity. *J Lab Clin Med.* 1975; 55: 337-341.
- Wojtecka-Lukasik E, Czuprynska K, Maslinska D, Gajewski M, Gujski M, Maslinski S.** Taurine-chloramine is a potent

antiinflammatory substance. *Inflam Res.* 2006; 55(1): 17-18.

Yousef MI, El-Demerdash FM. Acrylamide-induced oxidative stress and biochemical perturbations in rats. *Toxicology.* 2006; 219: 133-141.

Yuan LQ, Liu W, Cui RR, Wang D, Meng JC, Xie H, Liao YE. Taurine inhibits osteoclastogenesis through the taurine transporter. *Amino Acids,* 2010; 39(1): 89-99.

Zhang JX, Yue WB, Ren YS, Zhang CX. Enhanced fat consumption potentiates acrylamide-induced oxidative stress in epididymis and epididymal sperm and effect spermatogenesis in mice. *Toxicol Mech Methods.* 2010; 20 (2): 75-81.

Zhang L, Zhang H, Miao Y, Wu S, Ye H, Yuan Y. Protective effect of allicin against acrylamide-induced hepatocyte damage in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol.* 2012; 50: 3306-3312.

Zhang Y, Zhang G, Zhang Y. Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods. Review and recent developments. *J Chrom A.* 2005; 1075: 1-21.

Zhang L, Wang E, Chen F, Yan H, Yuan Y. Potential protective effects of oral administration of allicin on acrylamide-induced toxicity in male mice. *Food Funct.* 2013; 4: 1229.

Zulli A. Taurine in cardiovascular disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2011; 14: 57-60.

Antioxidant Safety and Antioxidant-induced Stress

Recep ASLAN

¹ *Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, Afyonkarabisar, TURKEY*

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

ABSTRACT

The safe use of antioxidants and reliable antioxidant applications are a new and important area of debate that has been continuing for decades. Today, antioxidant plants, phytochemicals and products are the most popular supplements. Most of them are sold without a prescription, even though they are used like a medicine. We know many scientific reports on the benefits of antioxidants but there are also studies that question whether antioxidant products have harmful effects. Nowadays antioxidant safety is the one of the most important medical topics at oxidant-antioxidant balance and oxidative stress. A physiological balance exists between oxidants and antioxidants in the organism only when both of the forces are present. Studies which document that antioxidant supplementation, inhibits the reactions and effects of free radicals are common. But, it is still unclear which exogen antioxidants and doses should be used to have an effective defense and also what safe limit is for use. It is possible that many of antioxidant phytochemicals and supplements can cause harmful changes in tissues by initiating different mechanisms. The most important question related to the use of antioxidants and antioxidant safety is the names, amounts, kinds and forms of them. The term antioxidative stress is a new strategic word on oxidant-antioxidant balance as like as oxidative stress. Antioxidants may cause stress in tissues which refers to antioxidative stress. An extraordinary attention on antioxidative stress is a necessity for today's medical disciplines. The further studies are needed to clarify the harmful effects of antioxidants and antioxidative stress for the antioxidant safety. We aimed to focus on the antioxidant-induced stress. For this reason, some reports on the harmful effects of antioxidants have been discussed in this paper.

Keywords: antioxidative stress, harmful effects of antioxidants, antioxidant safety

Antioksidan Güvenliği ve Antioksidan Kaynaklı Stres

ÖZ

Antioksidanların güvenli kullanımı ve güvenilir antioksidan uygulamaları, on yıllar boyu devam edecek yeni ve önemli bir tartışma alanıdır. Günümüzde antioksidan bitkiler, fitokimyasallar ve antioksidan ürünler en popüler tıbbi ürünlerdir. Büyük çoğunluğu ilaç gibi kullanılmasına rağmen bu ürünler reçetesiz satılır. Antioksidanların yararları hakkında birçok bilimsel rapor biliyoruz, ancak olası zararlı etkilerini sorgulayan araştırmalar ve önemli raporlar da mevcuttur. Aslında antioksidan güvenliği, oksidan-antioksidan denge açısından çok önemlidir. Organizmadaki oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki fizyolojik denge, bu kuvvetlerin her ikisi de geçerli olduğunda dengelenir. Antioksidan takviyesinin serbest radikal ürünleri, reaksiyonları ve etkilerini engellediğini belgeleyen çalışmalar yaygındır. Ancak, etkili bir antioksidan savunmaya sahip olmak için hangi ajanların ve hangi miktarların gerekli olduğu ve hangi dozun kullanım için güvenli limiti yansıttığı hala bilinmemektedir. Ekzojen antioksidan fitokimyasalların ve eklerin çoğu, farklı mekanizmalar başlatarak dokularda zararlı değişikliklere neden olabilir. Antioksidan kullanımı ile ilgili en önemli nokta, antioksidan güvenliği için bunların çeşitleri, formları ve dozlarıdır. Antioksidatif stres terimi oksidatif stres gibi oksidan-antioksidan dengesinde yeni bir stratejik kelimedir. Antioksidanlar, dokuları antioksidatif stres olarak adlandırılan strese yönlendirebilir. Olağanüstü bir dikkat ve antioksidan strese odaklanmak, bugünün medikal disiplinleri için bir zorunluluktur. Antioksidan güvenlik için antioksidan ve antioksidan stresin zararlı etkilerini aydınlatmak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz. Bu derlemenin amacı antioksidan kaynaklı strese odaklanmaktır, bu nedenle bu çalışmada antioksidanların zararlı etkileri hakkındaki mevcut kanıtlar analiz edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Antioksidan güvenliği, antioksidatif stres, antioksidanların zararlı etkileri

To cite this article: Aslan R.. *Antioxidant Safety and Antioxidant-induced Stress* . *Kocatepe Vet J*. (2018) 11(4):491-496.

INTRODUCTION

Oxidative stress is the imbalance among the production, scavenging and removing of reactive oxygen and nitrogen metabolites (ROS/NOS) leading to potential oxidative damage. ROS and NOS are considered to be the toxic byproducts of aerobic metabolism. Despite this, they are always not harmful and they also have some benefits. Nowadays, it is clear that ROS and NOS may manage many physiological processes such as induction of stress response, systemic signaling and pathogenic defense (Aslan, 1999; Koçyiğit and Selek, 2016). Our main emphasis is not the beneficial effects of reactive species. We aimed to emphasize the possible harmful effects of antioxidants.

The imbalanced antioxidant potential and increased antioxidant activity is called antioxidative stress. It was reported that antioxidant-induced stress may be as dangerous as well as oxidative stress (Dündar and Aslan, 2000). There are various reports on harmful effects of exogenous antioxidants in case of overconsumption. Antioxidants can deactivate ROS/NOS and reduce oxidative stress. This is not always auspicious in relation to disease formation and for adjourning aging (Pechanova et al., 2009; Narwaley et al., 2011; Poljask and Milisav, 2012). There are theories that the evolution of aerobic organisms is a consequence of the gradual adaptation of oxygen. Cellular antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) are believed to facilitate this adaptation (McCord et al., 1971).

Antioxidant enzyme activities regulate oxidant-antioxidant redox. SOD, CAT, GSH-Px, which helps the removal of over increased reactive species. However, endogenous antioxidant reactions are supported with exogenously reducing agents, such as vitamin E, vitamin C, lipoic acid, carotenoids, polyphenols and phytochemicals, which play an obligatory role in many antioxidant mechanisms in aerobic organisms. For this reason, there is a serious requisition for exogenous antioxidants to prevent the oxidative stress circle. However, this fact must also be considered. Because some studies show that many antioxidant substances such as nitric oxide and melatonin also can take an oxidative role (McCord et al., 1971; Aslan and Dündar, 1998; Munik and Ekmekcioğlu, 2015).

An antioxidant does not always exhibit the same antioxidant effect, even that it is not effective at all (Çevik and Aslan, 2015, Evcimen et al., 2018). An antioxidant has a weak antioxidant effect in some tissues, , but in the other tissues has a strong antioxidant effect (Evcimen et al., 2018). Since antioxidant safety is the target in this study,

antioxidant-induced stress will be discussed. We aim to review reports and evidences on antioxidant stress-induced deleterious roles on health, disease and aging.

Antioxidant Safety

Although reactive species are always not harmful, antioxidants are not necessarily useful (Halliwell and Gutteridge, 1995). They try to give or take an electron to complete the pair. But by pairing, antioxidants cannot complete themselves and thus, act like reactive species. These reactive antioxidants are tried to recycle by other antioxidants. In aerobic metabolisms, it is all a matter of equilibrium (Villanueva and Cross, 2012). However, this balance can be broken if antioxidant levels overrun the reactive species. The term "antioxidative stress" is suggested for such unbalance (Dündar and Aslan, 2000).

Recent, extraordinary attention has been paid to effects of exogenous antioxidants and antioxidant supplements. Are exogenous antioxidants always safe? What is the safe dose of antioxidants and the safety margin? Which indicators can be antioxidative stress markers. These questions and many of others show that there must be a new approach on antioxidants and policy of antioxidant safety (Villanueva and Cross, 2012). Despite these questions, the reality does not change: Since aerobic life depends on free radicals and antioxidants, it is not possible to escape from them. For an antioxidant preparat used in medicine, ithis question should be discussed: How do these antioxidant agents fit with available physiologic free radical defense? There are to much data on reducing effects of antioxidants on oxidative stress. But, it is still unclear which antioxidants and which doses are effective (Dündar and Aslan, 2000). There are reports that physiologic amounts of beta carotene and vitamin C act as antioxidants, but at pharmacologic levels, they turn into prooxidants (Herbert, 1993). The query of whether the antioxidant-induced stress is expressed in a delicately integrated physiologic system is still unacknowledged (Gutierrez, 2006;) These are also important questions about antioxidant substances. For example, antioxidants are peroxidation inhibitors. An antioxidant as an inhibitor of lipid peroxidation, is unseemly to be beneficial if the oxidative injury is mediated by an assault on DNA proteins. From this point of view, many antioxidants may be thought to have the potential to accelerate free radical damage. If the antioxidants scavenge the radicals, antioxidant-derived radicals may causetissue damage (Villanueva and Cross, 2012).

Elevated amounts of exogenous and synthetic antioxidants play prooxidant role in the entity of

iron and copper ions (Azam et al., 2004). Prooxidant activity is related to the molecular structure and concentrations of antioxidants (Yen et al., 2003). In recent cell modeling studies, some polyphenolic compounds known as antioxidants, such as quercetin, catechin, and gallic acid, also show prooxidative effects at the same time (Robaszkiewicz et al., 2007).

In environments where antioxidants are present in high concentrations, metal ions have been reported to cause undesirable effects. For example, in the presence of metal ions, some antioxidant phytochemicals like epigallocatechin has been indicated to cause damage to isolated cell DNA. Some antioxidants as natural polyphenols have prooxidant activity with iron and copper ions. The mechanism of natural antioxidants is as follows: First, it removes hydrogen atoms (-RH) or electrons (-R-) on the reactive molecules. The second mechanism acts as a single oxygen activator when the antioxidant absorbs UV radiation or enters the antioxidation reaction as a transition metal ion chelator, or converts hydroperoxides to non-radical products. However, antioxidants show the most reductive power by increasing the harmful hydroxyl radical formation from peroxides by the Fenton reaction in the presence of metal ions, especially Fe³⁺ and Cu⁺. When antioxidant polyphenols destroy reactive molecules, they come back into less reactive phenoxy radicals balanced by delocalization of unpaired electrons round the aromatic ring. The prooxidant activities of antioxidant phenols are thought to be related to the hydroxyl groups number in the molecule. While prooxidant activities of mono and dihydroflavonoids can not be shown, it has been shown that flavonoids with more than three hydroxyl groups in B-group, significantly increase hydroxyl radical production by Fenton reaction. The prooxidant reactions of flavonoids may also depress their beneficial effects. It has been shown that high levels of antioxidant polyphenols lead to mitochondrial impairment and apoptosis. All of these, high amounts of exogenous and synthetic antioxidants may be potent stressors for tissues by reacting with beneficial reactive species for physiological homeostasis (Koçyiğit and Selek, 2016).

Antioxidant-Induced Stress

Antioxidants can become reactive substances when they lose or receive electrons as they react with radical species and they can become harmful (Sevanian et al., 1991). This fact is often disregarded by the authors who advocate the use of exogenous antioxidants: these compounds do not only function as an antioxidant, but also have a prooxidant action. In some conditions, the well

known antioxidant vitamin C, may act as a prooxidant. For example, vitamin C addition up to concentration of 0.2 mM potentiated 10 nM, increases iron induced lipid peroxidation, due to maximal increased thiobarbituric acid substances. Reduction of Fe³⁺ is a common accepted explanation for the prooxidation of vitamin C. The combination of vitamin C and iron cause intense oxidation of PUFA's and the prevalence of vitamin C to act as either a threatening factor or scavenging agent (Niki, 1991). It is reported that this combination causes intestinal tissue damage via lipid peroxidation (Herbert, 1993). Similar antioxidant prooxidant transformations have been shown for vitamin E as well:



Reaction 2 is equilibrium reaction. Cell membranes contains excess fatty acid over vitamin E molecules. This suggests that vitamin E is consumed while the fatty acid concentration is stable during peroxidation. Reaction 1 declares that the vit E/ fatty acid increases. The ratio LOOH/vit E accumulation of LOOH reverses reaction 3 and stimulates the propagation reaction 4. Optimal vitamin E should be given at such a dose that the propagation will effectively be inhibited. However, this vitamin E amount is not known exactly (Witting, 1980). Some studies demonstrate that exogenous antioxidants may also possess antioxidative stress potential under certain conditions, the interaction and cycling of antioxidants should also be reconsidered. Common scientific approach was that any dose of antioxidants were not harmful. Nowadays, harmful effects of antioxidants are investigated by different studies and further the safe use of antioxidants is recommended. Taking different doses of antioxidants may cause antioxidant-induced risks in tissues. They may even cause some serious consequences such as increased risk of heart attack. (Herbert, 1993). For example, more than 600 mg/day of tocopherols can interfere with the absorption of vitamins A and K, while 200 to 600 mg/d of it appear innocuous (Clarkson, 1995). Extended doses of 1 mg/day and 5 mg/day of selenium have been reported to have antioxidant-induced stress effects (Dündar and Aslan, 2000). Not only exogenous antioxidants, but also endogenous antioxidant enzymes can some times be antioxidative risk factors (Villanueva and Cross, 2012).

Redox potential of antioxidants could be related to the antioxidant-induced stress. The redox potential density of famous antioxidants can be listed as follows: β -carotene 0.65 V, vitamin E 0.50 V, flavonoids 0.25–0.50 V, vitamin C 0.01 V and uric acid 0.25 V (Martin et al., 1999). It is well known that the network of antioxidant called antioxidant defence is obligatory (Halliwell, 2008). α -tocopherol (α -TC) produces α -tocopheroxyl radical when it reacts with reactive molecules such as superoxide or peroxynitrite. α tocopheroxyl radical is then recycled to α - tocopheroxyl by different antioxidants such as vitamin C and glutathione. After ascorbic acid recycles vitamin E, it is transformed to the ascorbyl radical which has a lower reactivity than vitamin E. α -TC radical is also recycled to vitamin E by β -carotene. Therefore, application of vitamin E with other antioxidant is essential. It is also substantial to have prominent levels of antioxidants to allow recycling of antioxidants to reactive forms. Some conditions such as reduction of ascorbic acid in smokers, reduce antioxidant enzymes and endogenous antioxidant subtracts, and could affect the recycling of Vitamin E or other antioxidants, and could release α -TC radical available to produce lipoperoxidation. An other major effect of ascorbic acid is to recycle oxidized glutathione to reduced glutathione, and return carotenoid radicals to carotenoids. As a reduced form, dihydro-lipoic acid returns GSSG to GSH and turn back into the ascorbic ascorbyl radical. This indicates the common prooxidant effect of lipoic acid (Villanueva and Cross, 2012). Another way for antioxidant-induced effect is that some antioxidants exhibit prooxidant activity with transition metals. This is the situation of ascorbic acid which turns into an ascorbyl radical and hydroxy cinnamic acid in which phenolic groups are transformed into phenoxy reactive groups. Beta-carotene is also a good example of converting an antioxidant to a prooxidant effective agent. The carotenoid radical is produced by oxygen and iron ions in the oxidative part of the β -carotene. (Lakshman, 2004).

The other important way of active endogenous antioxidant defense is a submaximal aerobic exercise, every day. In summary, the harmful effects of antioxidants depend on its concentration, its redox potential, availability of other antioxidants and the transition metals. Even though it was not exactly indicated, the genetic history may also help to explain the stress induced effects of antioxidants. Synthetic or organic exogenous antioxidants, supplementary antioxidants and various supplementary products to strengthen our body may be antioxidative stressors. Hence, physiological doses of antioxidants and their safety ranges must be clarified. Increased amounts of

antioxidants may be risk for healthy organisms and overdoses cause damage like the one in hypervitaminosis (Poljsak and Milisav, 2012). Generally, the effects of endogenous antioxidant enzymes are not questioned because they are organismic, natural and balanced.

The other important point is the changing roles of some biomolecules such as nitric oxide, melatonin. Therefore, melatonin acts as a strong antioxidant. Studies showing the prooxidant effects of melatonin have been published. These studies report that the oxidative effects of melatonin may be related to the involvement of an important second messenger, calmodulin and the mitochondrial respiratory chain (Munik and Ekmekcioglu, 2015).

Oxidants may be beneficial for many physiological reactions in cells. Recently, it has become apparent that reactive oxygen and nitrogen species might control many beneficial physiological processes such as induction of stress response, pathogen defense, and systemic signaling. On the other hand, there are harmful effects of antioxidative stress that occurred in the overconsumption of synthetic antioxidants (Dündar and Aslan, 2000; Koçyiğit and Selek, 2016). Since there is no evidence of adverse effects of antioxidants, they are generally accepted as safe products. This is a common scientific mistake. It was declared that antioxidant therapy does not effect the diseases, and antioxidant therapy is validated only in experimental disease and cell culture models (Halliwell, 2009). Synthetic antioxidants and the high doses of exogenous antioxidant agents are not recommended, low doses of antioxidants are suggested to be beneficial only in those with antioxidant deficiency (Koçyiğit and Selek, 2016). In this direction, let's see some of the published studies that declare the harmful effects of antioxidant supplements. In a study made in Australia, hypertensive patients received treatment with Vitamin C (500 mg/day) and grape seed polyphenols (1000 mg/day). After six weeks, systolic-diastolic pressures and endothelium dependent vasodilation increased, while oxidative stress markers did not change (Ward, 2005). In a study on HDL atherosclerosis, an antioxidant treatment was applied for male and female patients having low HDL and triglyceride in which they treated with vitamin E (800 IU / day), vitamin C (1000 mg / day), beta carotene (25 mg / day) and selenium (100 μ g/day) . Other patient group had taken placebo. When the results were analyzed it is understood that antioxidant therapy did not support HDL elevation (Cheung, 2001). In another study, antioxidants vitamin C and N-acetylcysteine increased acute exercise induced oxidative stress in healthy persons. Acute exercise is already known to increase oxidative stress (Aslan et al., 1998), but

chronic or programmed exercise reduces the oxidative stress (Aslan and Dündar, 1998; Aslan et al., 1998; Ji, 2008).

It is interesting that both antioxidants can not suppress this stress, and even increase it. In this situation, the conversion of ascorbic acid into the ascorbyl radical by reactive species generated during exercise may be major factor (Childs et al., 2001). An other important antioxidant β -carotene has also similar effects. High redox potential of β -carotene can make it an effective of oxidizing molecules. β -carotene in high concentrations may oxidize DNA (Yeum et al., 2009). Another way that the antioxidant induced stress may be the normal responses of the organism to oxidative stress (Ji, 2008; Ristow et al., 2009).

CONCLUSIONS

We have insufficient data on the long-term effects of different doses of the exogenous and synthetic antioxidant supplements. For this reason, an awareness of unsafe doses of antioxidants should be established. Use of the term “antioxidative stress” might be substantial to the formation of a scientific mind against unsafe use of antioxidants. Studies on the use of safe antioxidants in medicine are needed to determine the ways and factors causing for the antioxidant induced stress. Hopefully, this study will stimulate further research on antioxidant-induced stress in animals and human beings. It was showed that antioxidant nutrients abolish the homeostasis by inhibiting an adaptive reaction to reactive oxygen and nitrogen metabolites. There are homeostatic mechanisms in cells that govern the amount of allowable antioxidant activity. Most organisms are able to maintain their oxidant-antioxidant balance. As a result, for beneficial physiological effects, exogenous and synthetic antioxidants should be well absorbed in the body, reach the medium of reactive oxygen and nitrogen species formation in cells and should be present in appropriate amounts.

REFERENCES

Aslan R, Şekeroğlu MR, Tarakçıoğlu M, Bayıroğlu F, Meral İ. Effect Of Acute And

Regular Exercise On Antioxidative Enzymes, Tissue Damage Markers And Membran Lipid Peroxidation of Erythrocytes in Sedentary Students. Turkish Journal of Medical Science 1998; 4(28): 411-15.

Aslan R, Dündar Y. Nitric Oxide as a Biophysiological Component and a Radical Metabolite. Hayvancılık Araştırma Dergisi 1998; 8(1-2): 34-38.

Aslan R. Homeostatik Mekanizmanın Korunması ve Sağaltımında Antioksidanlar. İlaç ve Tedavi Dergisi 1999; 12(8): 475-480.

Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM. Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. Toxicology. 2004;18: 555-61.

Cheung MC, Zhao XQ, Chait A, Albers JJ, Brown BG. Antioxidant supplements block the response of hdl to simvastatin-niacin therapy in patients with coronary artery disease and low hdl. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001; 21: 1320-1326.

Childs A, Jacobs C, Kaminski T, Halliwell B, Leeuwenburgh C. Supplementation with vitamin c and n-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. Free Radic. Biol Med. 2001; 31: 745-753.

Clarkson PM. Antioxidants and physical performance. Critical Reviews in Food and Nutrition. 1995; 35(1-2): 131-141.

Çevik C, Aslan R. Effects of photoperiod variations and alpha-lipoic acid treatment on melatonin, cortisol, and oxidative stress levels in the blood of rats. Turk J Biol 2015; 39: 941-949.

Dündar Y, Aslan R. Antioxidative stress. Eastern J Med. 2000; 5: 45-47.

Evcimen M, Aslan R, Gulay MS. Protective effects of polydatin and grape seed extract in rats exposed to cadmium. Drug and Chemical Toxicology June 2018; DOI:10.1080/01480545.2018.1480629

Gutierrez J, Ballinger SW, Darley-USmar VM, Landar A. Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: The emerging role in signal transduction in vascular cells. Circ Res. 2006; 99: 924–932.

Halliwell B, Gutteridge JM. The definition and measurement of antioxidants in biological

- systems. *Free Radic Biol Med.* 1995; 18: 125–126.
- Halliwell B.** Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch Biochem Biophys.* 2008; 476: 107-112.
- Halliwell B.** The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med.* 2009; 46: 531-542.
- Herbert V.** Viewpoint does mega-C do more good than harm, or more harm than good? *Nutrition Today* 1993; 28: 126-33.
- Ji LL.** Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44: 142-152.
- Lakshman MR.** Alpha and omega of carotenoid cleavage. *J Nutr.* 2004; 134:241S-245S.
- Martin HD, Ruck C, Schmidt M, Sell S, Beutner S, Mayer B, Walsh R.** Chemistry of carotenoid oxidation and free radical reactions. *Pure Appl Chem.* 1999; 71: 2253-2262.
- McCord JM, Keele BB, Fridovich I.** An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: The physiological function of superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci.* 1971; 68: 1024-1027.
- Munik MS, Ekmekcioğlu C.** Prooxidant effects of melatonin: a brief review. *Turk J Biol.* 2015; 39: 832-839.
- Narwaley M, Michail K, Arvadia P, Siraki AG.** Drug-induced protein free radical formation is attenuated by unsaturated fatty acids by scavenging drug-derived phenyl radical metabolites. *Chem Res Toxicol.* 2011; 24: 1031-1039.
- Niki E.** Vitamin C as an antioxidant. *Vitamins, Minerals, and Functional Consequences of Maternal Malnutrition.* World Res. Nutr. Diet. Basel Karger. 1991; 64: 4-30.
- Pechanova O, Simko F.** Chronic antioxidant therapy fails to ameliorate hypertension: Potential mechanisms behind. *J Hypertens.* 2009; 27: 32-36.
- Poljsak B, Gazdag Z, Jenko-Brinovec S, Fujs S, Pesti M, Belagyi J, Plesnicar S, Raspor P.** Pro-oxidative vs antioxidative properties of ascorbic acid in chromium-induced damage: An in vivo and in vitro approach. *J Appl Toxicol.* 2005; 25: 535-548.
- Poljsak B, Milisav I.** The Neglected Significance of “Antioxidative Stress” Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2012; P:1-12 doi:10.1155/2012/480895
- Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Kloting N, Birringer M, Kiehntopf M, Stumvoll M, Kahn CR, Bluher M.** Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci.* 2009; 106: 8665-8670.
- Robaszkiewicz A, Balcerczyk A, Bartosz G.** Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell biology international* 2007; 31: 1245-50.
- Sevanian A, Davies KJ, Hochstein P.** Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. *Am J Clin Nutr.* 1991; 54: 1129S-1134S.
- Ward NC, Hodgson JM, Croft KD, Burke V, Beilin LJ, Puddey IB.** The combination of vitamin c and grape seed polyphenols increases blood pressure: A randomized, double blind, placebo controlled trial. *J Hypertens.* 2005; 23: 427-434.
- Witting LA.** Vitamin E and lipid antioxidants in free radical-initiated reactions. In Priyor A (ed) *Free radicals in biology.* IV. New York Academic Press. 1980; 295-319.
- Villanueva C, Kross RD.** Antioxidant-Induced Stress. *Int J Mol Sci.* 2012; 13(2); 2091-109.
- Yen GC, Duh PD, Tsai HL, Huang SL.** Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry.* 2003; 67: 1215-22.
- Yeum KJ, Aldini G, Russell RM, Krinsky NI.** Antioxidant/pro-oxidant Actions of Carotenoids. In *Carotenoids.* Birkhäuser Verlag: Basel, Switzerland. 2009; 5: 235-268.

Köpek Epidermisinin pH Seviyesi: Gelişigüzel İnsan Ürünleri Pet Hayvanlarda Kullanılabilir mi?

Kerem URAL^{1*}, Hasan ERDOĞAN¹, Deniz Sude ATEŞ¹

¹*Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Aydın/TÜRKİYE*

*Corresponding author e-mail: kural@adu.edu.tr

ÖZ

Masum olarak bilinen (pet hayvanlarına yönelik) bebek şampuanlarının bir köpeğin epidermisi için 150 kat fazla asidik olduğunu biliyor muydunuz? Aslında bu editöre mektup tarzında hazırlanan makale ile hem klinisyen meslektaşlarımıza hem de hasta sahiplerine ortak dille hitap etmeyi amaçladık.

Anahtar Kelimeler: Köpek, Epidermis, pH

pH Level of Dog Epidermis: Could Human Products Be Used Randomly in Pet Animals?

ABSTRACT

Did you know that innocent baby shampoos (for pet animals) are 150 times more acidic for the epidermis of a dog? In fact, with this article in the form of an editorial letter, we aimed to address both our clinician colleagues and patient patients.

Keywords: Epidermis, dog, pH

To cite this article: Ural K, Erdoğan H, Ateş D.S. Köpek Epidermisinin pH Seviyesi: Gelişigüzel İnsan Ürünleri Pet Hayvanlarda Kullanılabilir mi?. Kocatepe Vet J. (2018) 11(4): 497-500.

GİRİŞ

Son dönemlerde giderek artan sayıda olguda, hasta sahiplerince değişik içerikli şampuanların yıkama/sağaltım amacı ile kullanıldığına şahit olmaktayız. Oysaki her olgunun türe özgü 'unique' yani 'benzersiz' bir deri mikrobiyotası mevcuttur. pH değişiklikleri bu bağlamda deride mikrobiyata değişiklikleri ile iç içe geçmiş vaziyettedir (Grice ve ark. 2011, Mauro ve ark. 1998, Öhman ve ark. 1994). Kullanılan her yanlış topikal bileşim deri pH'sında değişime eşlik etmekte ve farklı/istenmeyen özelliklerde mikrobiyata değişikliklerine adeta çanak tutmaktadır. İnsanların köpeklerini (pH değeri bilinmeyen) sabun ya da bebek şampuanı ile yıkaması ve kabartma tozu, gargara, sirke gibi ürünlerle "hayvanların üzerine bocalamasının" yaygın olduğunu biliyoruz. Bu basit ürünlerin köpek derisini ciddi şekilde tahriş edebileceğine dair kanıtlar vardır, çünkü köpeğin derisine göre farklı bir pH seviyesi ve yoğunluğu vardır:

Pet hayvanlarda ve insanlarda ki epidermal pH seviyeleri:

-Köpeklerde Pet hayvanlarda 7-7,52 (Ruedisueli ve ark. 1998) 7,48 (köpekte böğür pH'sı

-İnsanlarda 5,2-5,5 (Kim ve ark. 2006).

Köpeklerde deri pH'sını etkileyen faktörler: ırk, cinsiyet, integümenter örtünün rengi, anatomik bölge, deri fizyolojisi, çevresel iklimik koşullar, coğrafi lokalizasyon (Mason 1993); seboreik dermatitiste alkalitede artış (Ruedisueli ve ark. 1998). Belirgin asidite mayaların üremesinin kolaylaştırır (Korting ve ark. 1991).

Köpeğin derisi, tüm türlerin içerisinde en alkali olanıdır (Draize ve ark. 1942) ve pH bozulursa bakteriler için uygun bir üreme alanına dönüşmekte, ardından epiderminin aşırı kuruması ve aşınması nedeniyle iltihaplanma ve enfeksiyon meydana gelebilir. Bir köpeğin epidermisi yalnızca 8-10 hücre tabakası kalınlığında iken, insanın 18-20 hücre tabakası kalınlığındadır (Lloyd ve ark. 1982, Mason ve ark. 1993). Köpeğin derisi genel olarak daha kalındır, fakat epidermis çok ince olup, pH'sı uygun olmayan maddelerle temas ederse epidermiste ki soyulma, deriyi bakterilere karşı açık hale getirir.

Ne yazık ki çok alkali bir ürünün, çok asidik bir ürün kadar zarar verebileceği bilinmiyor ya da göz önünde bulundurulmuyor. Sülfürik asit gibi asidik değeri çok yüksek bir ürün, temel olarak insan epidermisini yakarken; Lye (kül suyu, alkali sıvı) gibi çok alkali ürünler de insan epidermisi üzerinde iltihap ve hatta kimyasal yanıklar oluşturabilir (Barel

ve ark. 2001, Korting ve ark. 1991). Aynı şey bir köpeğin epidermisi için de geçerlidir.

İnsan eli ile köpeklerde kullanılan bazı ürünlerin pH seviyeleri aşağıda Tablo 1'de verilmiştir.

Siz değerli okuyuculara biraz da bu yukarıdaki önemli bilgilere ilaveten bilimsel bazı verilere, retrospektif olarak son dönemde üst üste muayene, teşhis ve sağaltımına iştirak ettiğimiz ve kliniğimize getirilmeden önce gelişigüzel ve pH'sı belirsiz ilaç ya da değişik orijinli solüsyonların kullanıldığı bazı olguların deri pH'sına ilişkin bulguları aktarmak istiyoruz.

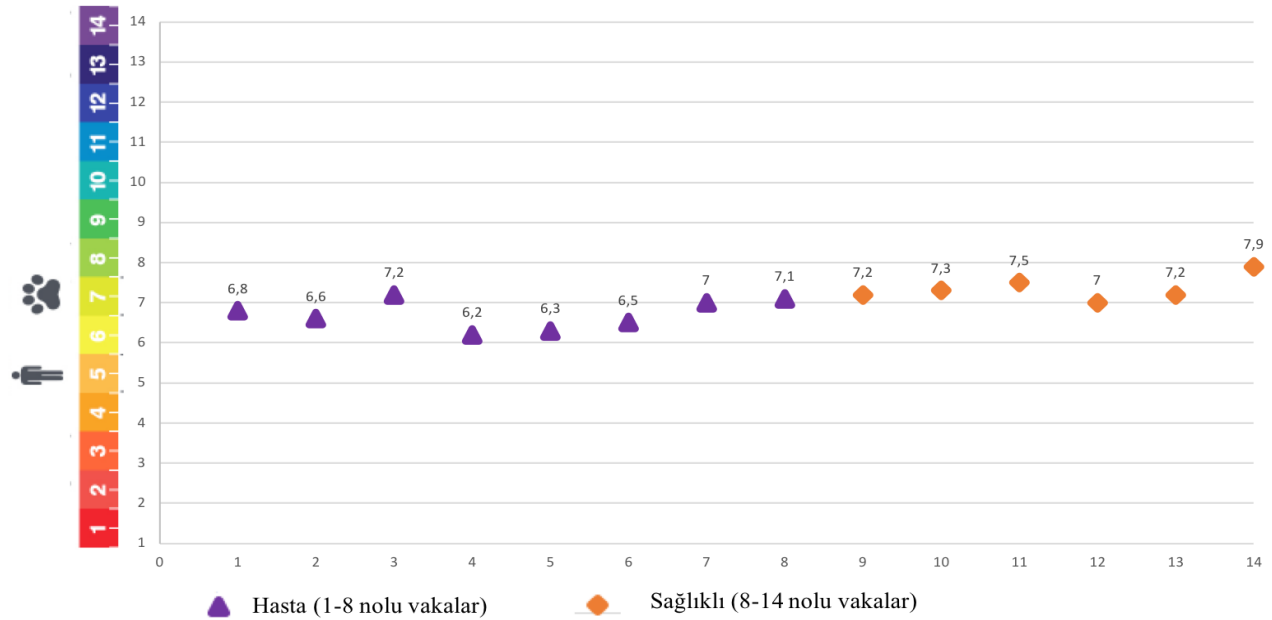
Son dönemde Fakülte Kliniğimize kazandırmaktan gurur duyduğumuz özel, benzersiz karakterde (fleksiyon mod) yalnızca deri analiz sistemi olarak üretilmiş aynı zamanda hem deri hem de kıl/tüy sağlığına ait biofiziksel parametrelerin ölçümüne spesifik Callegari Soft Plus (Callegari 1930, İtalya; Türk tarafı tedarik RDA Grup, İstanbul, Türkiye) cihazı ile tabiri caiz ise derinin haritasını çıkarmaktayız. Bu bağlamda yine yakın zamanda analizi gerçekleştirilen olgularımızın (alerjik dermatitis tanısı konulan 2-7 yaşlı, farklı ırk ve her iki cinsiyetten) epidermal pH değerleri aşağıda şekil 1'de sunulmaktadır. Hasta olgulara ait epidermal pH seviyeleri 6,2-7,2 arasında değişirken, sağlıklı kontrol grubu köpeklerde 7-7,9 arası olduğu belirlenmiştir. Köpekte optimal değer 7 ve üzeri olduğu düşünüldüğünde hasta 8 olgunun 5'inde pH'nın asit karakter taşıdığı ve rastgele ilaç/topikal uygulamalarda bulunulduğu öğrenildi. Hasta grupta pH'sı değişmemiş olguların şans eseri hiçbir ilaç kullanılmadan kliniğe getirilmeleri doğal hastalık aktivitesinin bozulmadığına işaret olabilir. Yine de anılan bu 3 olguda da pH değerinin 7,5 altında olması dikkat çekici idi (Şekil 1). Hasta ve deri pH'sı bozulmuş 5 olgunun tamamında sağaltım amacı ile *Curcuma longa* (turmerik; zerdeçal) ile *Nigella sativa* (black cumin; çörek otu) kombinasyonu içeren topikal/oral solüsyon (Dermacumin, Veterinary Herbal Medicine A.Ş., Antalya; Hammadde imalat ve tedarik, Naturalya Kimya Gıda İlaç Veterinerlik San.Tic.Ltd.Şti, Antalya) günde 3'er kez lezyon üzerine taşkın şekilde en az 1 hafta süre ile topikal olarak uygulandı.

Sonuç olarak uygun olmayan ve insanlarda kullanılabilecek ürünlerin rastgele bir evcil hayvan üzerinde ASLA kullanılmamalıdır. Evcil hayvan ürünlerinin ticari olarak elde edilen formülasyonları, derisinin tahriş olmaması için pH dengeli olarak formüle edilen preparatlar Veteriner Hekim kontrolünde ve tavsiyesinde kullanılmalıdır.

Tablo 1: PH ölçeğinde bir sayıdan diğerine geçtiğinizde, 10 kez 10 veya 100 kat farklılaşmaya dair bir değişikliği gösterir (Brady ve Humiston, 1990). Örneğin, eğer 7'den 5'e gidildiyse, bu 200 kat daha asidik veya 7'den 9'a kadar, yani 200 kat daha alkalidir. Bu, bulaşık sabununun bir köpeğin epidermisine yaklaşık 250 kat daha alkali olduğu anlamına gelir.

Table 1: When you move from one number to another on a PH scale, it shows a change of 10 or 100 times differentiation 10 times (Brady ve Humiston, 1990). For example, if you go from 7 to 5, it is 200 times more acidic or 7 to 9, or 200 times more alkaline. This means that the dish soap is about 250 times more alkaline than the epidermis of a dog.

Haricen ve rastgele kullanılan bazı preparatlar (marka) bebek şampuanı	Aynı ürünün pH değeri
Kabartma tozu (sodyum bikarbonat)	pH 5,5 (Bebek şampuanı yaklaşık köpeğin epidermisine 150 kat daha asidik)
Sirke	pH 8,3 (Kabartma tozu yaklaşık köpeğin epidermisine 130 kat daha alkali).
(marka) diş macunu	pH 2,2 (Sirke yaklaşık köpeğin epidermisine 500 kat daha asidik)
Bulaşık deterjanı	pH 4,2
Gargara	pH 9,5
	Yaklaşık olarak köpeğin epidermisine 200 kat daha asidik.



Şekil 1: Hasta ve sağlıklı köpeklerde deri pH'sına ait değerlendirme. Olgu I. Pug, 2 yaşlı erkek; Olgu II. Sibiryan Huskey 3 yaşlı erkek; Olgu III Jack Russell 2,5 yaşlı dişi; olgu IV Alman Çoban Köpeği; olgu V Golden Retriever 2 yaşlı; olgu VI French bulldog 2,5 yaşlı; olgu VII Alman Çoban köpeği; olgu VIII 4 yaşlı Pug; sağlıklı olgular aynı yaş aralığından eşleştirilmiş/dermatolojik bozukluğu ya da bilinen hastalığı mevcut olmayan olgular.

Figure 1: Evaluation of skin pH in sick and healthy dogs. Case I. Pug, 2 years male; case II. Siberian Husky 3 years male; case III. Jack Russell 2.5 years female; Case IV German shepherd dog, case V Golden Retriever 2 years; case VI French Bulldog 2.5 years; case VII German shepherd dog; case VIII 4 years Pug; healthy cases are cases of paired / dermatologic disorder or no known disease from the same age range.

KAYNAKLAR

Barel AO, Lambrecht R, Clarys P, Morrison BM, Paye M. A comparative study of the effects on the skin of a classical bar soap and a syndet cleansing bar in normal use conditions and in the soap chamber test. *Skin Res Technol.* 2001; 7(2):98–104.

Brady JE, Humiston GE, Heikkinen H. General chemistry: principles and structure Wiley New York, USA. 1990; pp. 48-64.

Draize JH. The determination of the pH of the skin of man and common laboratory animals. *J Invest Dermatol.* 1942; 5(2):77–85.

Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 9(4):244.

- Kim MK, Choi SY, Byun HJ, Huh CH, Park KC, Patel RA, Youn SW.** Comparison of sebum secretion, skin type, pH in humans with and without acne. *Arch Dermatol Res.* 2006; 298(3):113.
- Korting HC, Megele M, Mehringer L, Vieluf D, Zieneke H, Hamm G, Braun-Falco O.** Influence of skin cleansing preparation acidity on skin surface properties. *Int J Cosmet Sci.* 1991; 13(2):91-102.
- Král F, Schwartzman RM.** *Veterinary and Comparative Dermatology.* Philadelphia: J B. Lippincott. 1964:1–14.
- Lloyd DH, Garthwaite G.** Epidermal structure and surface topography of canine skin. *Res Vet Sci.* 1982;33(1):99–104.
- Mason IS.** Scanning electron microscopical studies of the living epidermis and stratum corneum in dogs. *Vet Dermatol.* 1993; 2:131-139.
- Matousek JL, Campbell KL, Kakoma I, Solter PF, Schaeffer DJ.** Evaluation of the effect of pH on in vitro growth of *Malassezia pachydermatis*. *Can J Vet Res.* 2003; 67(1):56.
- Mauro T, Grayson S, Gao WN, Man MQ, Kriehuber E, Behne M, Elias PM.** Barrier recovery is impeded at neutral pH, independent of ionic effects: implications for extracellular lipid processing. *Arch Dermatol Res.* 1998; 290(4):215–222.
- Öhman H, Vahlquist A.** In vivo studies concerning a pH gradient in human stratum corneum and upper epidermis. *Acta Derm Venereol.* 1994; 74:375–375.
- Ruedisueli FL, Eastwood NJ, Gunn NK, Watson TDG.** The measurement of skin pH in normal dogs of different breeds. 1998.

Hepatic Fibrosis in Four German Shepherd Dogs Idiopathic, Genetic Predisposition or a Familial Relationship?

Hadi ALİHOSSEİNİ^{1*}, Ekrem Çağatay ÇOLAKOĞLU², Arif KURTDEDE², Ali Evren HAYDARDEDEOĞLU³

¹Veterinary Practitioner, Therapist Veterinary Medical Center, İstanbul, Turkey

²Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Ankara, Turkey

³Aksaray University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Aksaray, Turkey

*Corresponding author e-mail: hadi.alihosseini@gmail.com

ABSTRACT

Idiopathic hepatic fibrosis (İHF) is an inevitable result of chronic liver disease progressing to cirrhosis. Idiopathic Hepatic fibrosis is characterized as congenital or juvenile form in German Shepherd Dogs. However, few data have been published on the incidence and prevalence of İHF in canine species. The case report presented here describes idiopathic hepatic fibrosis in four neutered German Shepherd dogs with a familial relationship. The main clinical complaints were refractory ascites, variable appetite and progressive weight loss. Hepatic fibrosis was confirmed with diagnostic applications and liver biopsy. Nevertheless, all dogs died in spite of supportive and aggressive treatment. Necropsy was performed in the dogs according to written owner consent. In conclusion, the cases presented here reflect the congenital condition of idiopathic hepatic fibrosis in young German Shepherd Dogs with histopathological evidence. However, there was evidence of familial relationship in the cases presented here.

Keywords: Dog, fibrosis, genetic, liver, idiopathic

Dört Alman Çoban Köpeğinde Hepatik Fibroz İdiyopatik, Genetik Yatkınlık ya da Ailesel İlişki mi?

ÖZ

İdiyopatik hepatik fibroz (İHF) siroza kadar gidebilen kronik karaciğer hastalığının kaçınılmaz bir sonucudur. İdiyopatik hepatik fibroz, Alman Çoban Köpeklerinde juvenil ya da doğmasal olarak şekillenebilmektedir. Bununla birlikte, köpeklerde İHF'nin prevalans veya insidansı hakkında az sayıda veri bulunmaktadır. Sunulan olgu serisi, ailesel ilişkisi bulunan dört Alman Çoban Köpeğindeki idiyopatik hepatik fibrozu tanımlamaktadır. Olgulardaki esas klinik şikayetler; tekrarlayan asites, değişken iştah durumu ve ilerleyici kilo kaybıydı. Hepatik fibroz tanısı diyagnostik uygulamalar ve karaciğer biyopsisi ile doğrulandı. Destekleyici agresif tedaviye rağmen tüm köpekler kaybedildi. Hasta sahibinin izni ile köpeklerde nekropsi gerçekleştirildi. Sonuç olarak, sunulan olgular Alman Çoban Köpeklerinde histopatolojik kanıtı olan konjenital idiyopatik hepatik fibrozu yansıtmaktadır. Bununla birlikte, sunulan olgularda ailesel ilişki kanıtı da söz konusudur.

Anahtar Kelimeler: Fibroz, genetic, idiyopatik, karaciğer, köpek

To cite this article: Alihosseini H. Çolakoğlu E.Ç. Kurtdede A. Haydardedeoğlu A.E. Hepatic Fibrosis in Four German Shepherd Dogs Idiopathic, Genetic Predisposition or a Familial Relationship? Kocatepe Vet J. (2018) 11(4): 501-507.

INTRODUCTION

Hepatic fibrosis, as a consequence of chronic liver disorders, is a dynamic process including complicated interactions between several hepatic cell types and accumulation of obvious extracellular matrix (ECM) proteins (Brown et al. 2010, Eulenberg and Lidbury 2018). The hepatic remodeling with deterioration of intrahepatic blood flow can lead to development of portal hypertension (PHT). Although increased resistance to portal blood flow can cause the formation of supportive acquired portosystemic shunts (PSS), animals with PHT can also increase abdominal lymphatic fluid production resulting with ascites (Desmet 1998).

Hepatic fibrosis based on the location of fibrosis has been categorized into three forms: central perivenous fibrosis, diffuse pericellular fibrosis and periportal fibrosis (Brown et al. 2010). German Shepherd dogs have appeared to be predisposed to central perivenous and diffuse pericellular fibrosis (Rutgers et al. 1993). It has been reported that idiopathic form of hepatic fibrosis in young German Shepherd dogs has not associated with underlying inflammatory conditions. The cases presented here reflect idiopathic hepatic fibrosis with biliary cirrhosis in four German Shepherd dogs with a familial relationship.

MATERIAL and METHOD

Four German Shepherd dogs with a history of variable appetite, progressive weight loss and abdominal distention for two weeks referred to Veterinary Teaching Hospital of Ankara University. The dogs had referred to Hospital within three weeks at different times. All dogs were in familial relationship and from the 1st and 2nd generation of the same parents (Figure 1). All dogs had also essential antiparasitic therapy and routine vaccination against the infections of rabies, distemper, parainfluenza, herpes virus, parvoviral enteritis and leptospirosis. The dogs were feeding with super-premium commercial dry food. In physical examination, all dogs were alert. Signalment and detailed physical examination findings were shown in Table 1. They also had pinky mucosal membranes and moderate dehydration with abdominal distention associated with ascites (Figure 2).

Peripheral blood smears and heartworm antigen test kit (IDEXX® Snap 4DX plus test) revealed any abnormalities for rickettsial infection and dirofilariasis in all dogs. Complete blood count results were presented in Table 2. Elevated levels of total and direct bilirubin, severe increase in ALP,

ALT, AST and GGT activities, mild increase in ammonia concentration, severe increase in pre- and post-prandial bile acids were remarkable. The serum copper and total iron binding capacity (TIBC) were in reference ranges. Analysis of intraabdominal fluid also indicated transudate because of low protein concentration, hypocellularity and lack of blood and bacteria. Microbiological culture of the abdominal fluid revealed no pathogen. The result of serum profiles and intraabdominal fluid analysis were presented in Table 3.

For the possibility of any food poisoning in dogs, dry food of animals were evaluated in the food analysis laboratory. The results of food analysis revealed no microbiological and toxic contents including mycotoxins or others (Table 4).

Radiographic and echocardiographic examinations of the thorax ruled out for congenital and acquired heart disease in all dogs. Abdominal ultrasonography revealed severe free fluid (Figure 3a), microhepatica with diffuse heterogenous liver tissue (Figure 3b), portal hypertension (12 mm Hg, only in case 2) and cholecystitis (Figure 3c).

Cholangiohepatitis with portal hypertension was diagnosed considering clinical signs and diagnostic applications. All dogs was initiated the following medications: Ampicillin-sulbactam (25 mg/kg, bid, iv for 14 days, Alfasid, Yavuz İlaç), Enrofloxacin (5mg/kg, bid, sc for 14 days, Baytril K, Bayer), L-carnitine (500 mg, sid, po, Maxi L Carnitine, Solgar), vitamin E (10 IU/kg/day, po, Natural Vitamin E, Solgar), vitamin K (0.5 mg/kg, sc, weekly, Hemadur K, Alke), Silymarin (50 g/kg/day, po, Milk Thistle, Solgar), Ursodeoxycholic acid (7.5 mg/kg, bid, PO) and supportive fluid therapy with electrolyte and aminoacid solutions. Portal hypertension was also controlled by applying the Spironolacton (1mg/kg, bid, PO, Aldacton, Pfizer) and ascites was relieved by Furosemide (2 mg/kg, bid, PO, Lasix, Sanofi aventis). The clinical signs decreased within two weeks following the medication in all dogs and clinical improvement was confirmed by clinical examinations.

Three weeks later the clinical symptoms including anorexia, malaise, dehydration and severe abdominal distension relapsed in all dogs. The same paraclinical results were seen in the dogs. Severe ascites with serious cholecystitis were detected by ultrasonography in cases 2 and 4. Surgical cholecystectomy was employed in case 2. Liver biopsy was also performed during the cholecystectomy operation. The same treatment were repeated in dogs. It has not been observed

any improvement in clinical signs in spite of surgical cholecystectomy and mentioned treatment in following days. Nevertheless, all dogs died and necropsy was performed in case 2 according to written owner consent.

In the necropsy, about 400 cc of free fluid in the abdomen and old petechial hemorrhage in the fundic mucosa of the stomach was remarkable. Marked dilatation of mesenchymal vessels was also observed. Liver tissue samples collected from necropsy fixed in neutral-buffered formalin,

routinely processed and embedded in paraffin. The sections were cut at 5 μ m and stained with Haematoxylin and Eosin. The histological sections showed typical biliary cirrhosis with replacement of the regular pattern by pseudo-lobules. Internal lober structure of the liver were also abnormal. It was observed that the most of the erythrocyte and bile pigments were within the liver sinusoids. Proliferation of the connective tissue cells were surrounding the portal and interior areas of the lobules. (Figure 4a and 4b).

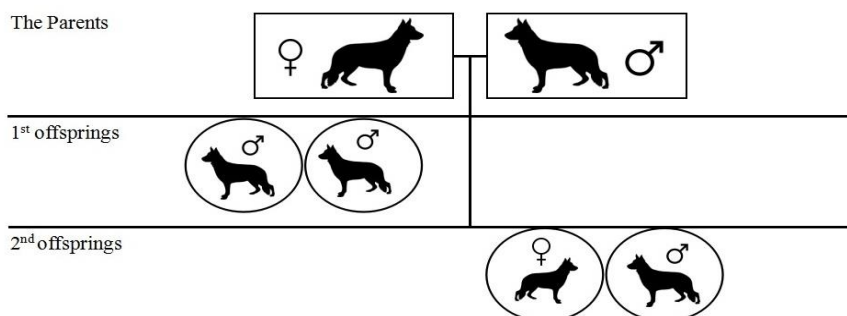


Figure 1. Family tree of the dogs: the 1st and 2nd offsprings from the same parents



Figure 2. The German Shepherd Puppy with abdominal distension in sternal (a) and standing position (b).

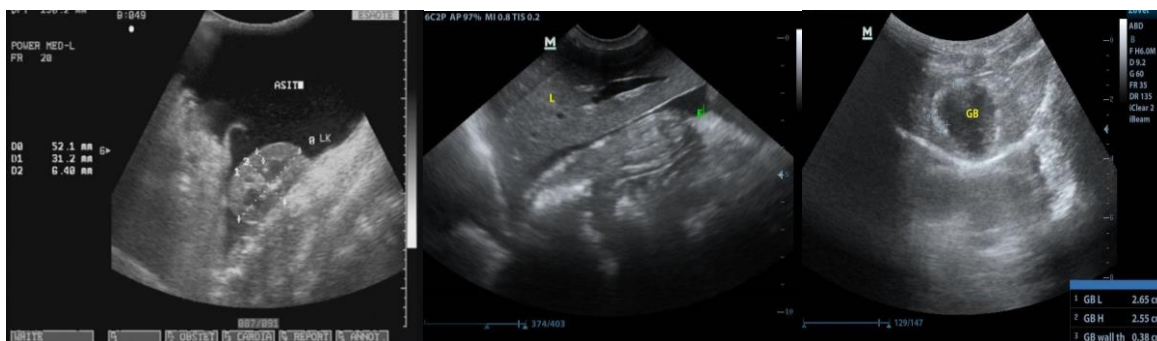


Figure 3. Abdominal ultrasonography in a German Shepherd dog with abdominal distension. a) Severe abdominal free fluid (ascites). b) Free fluid surrounding liver with mild increase in echotexture. c) Severe cholecystitis in 6 month old German Shepherd puppy.

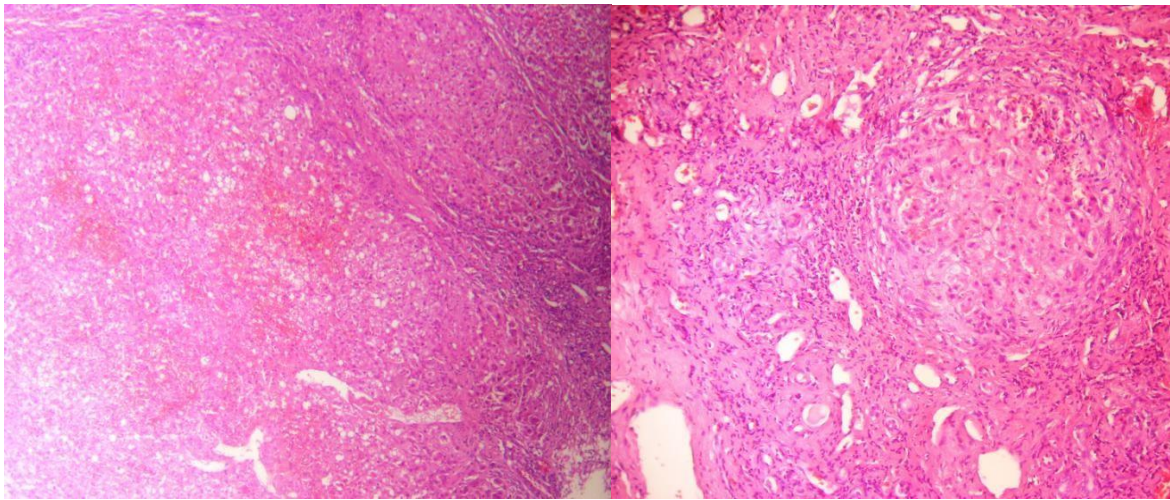


Figure 4. Histopathological sections (a,b)

Table 1. Signalment and physical examination findings in dogs

Signalment	1st generation puppies		2nd generation puppies	
Case Numbers	1	2	3	4
Sex	Male	Male	Male	Female
Age (month)	21	21	6	6
Weight (kg)	22,3	28	15	19
Posture	Alert and standing position	Alert and standing position	Alert and standing position	Alert and sternal recumbency position
Physical Examination	1st generation puppies		2nd generation puppies	
Case Numbers	1	2	3	4
Body Temperature (°C)	39.0	39.3	38.2	39.2
Heart Rate (bpm)	83	110	88	79
Respiration Rate (rpm)	34	37	34	32
Estimated Dehydration (%)	6 – 8	6 – 8	6 - 8	8 - 10
Mucosal Appearance	Pinky	Pinky-red	Pinky	Pinky-red

bpm: beat per minute; rpm: respiration per minute; s: second.

Table 2. Results of complete blood count in dogs

	Case Numbers			
	1	2	3	4
WBC (10⁹/l)	28.97	21.10	14.73	15.48
LYM (10⁹/l)	2.34	2.48	2.87	5.66
MON (10⁹/l)	1.28	1.01	0.97	0.1
GRA (10⁹/l)	25.35	19.88	10.89	9.73
LYM(%)	8.1	15.3	19.5	36.5
MON (%)	4.4	3.6	6.6	0.6
GRA(%)	87.5	77.3	73.9	62.8
RBC (10¹²/l)	3.65	4.41	5.75	6.10
HGB(g/dl)	9.0	11.0	13.0	14.0
HCT(%)	26.54	33.31	36.01	39.43
MCV (fl)	57	59	59	61
MCH(pg)	24.6	25.2	22.6	22.9
MCHC(g/dl)	33.8	33.1	36.2	35.5
RDWc(%)	17.5	16.6	16.0	15.4
PLT(10⁹/l)	104	325	277	424

Reference Ranges: WBC: 6-17; LYM: 0.9-5; MON: 0.3-2.5; GRA:3-12; GRA %: 35-70; LYM %: 12-30; MON %: 2-13; RBC: 5.5-8.5; HGB: 12-18; HCT: 37-55; MCV: 60-72; MCH: 19.5-25.5; MCHC: 32-38.5; RDWc: 12-17.5; PLT: 200-500

Table 3. Results of serum biochemistry profiles and intra-abdominal fluid analysis in dogs

	Case Numbers			
	1	2	3	4
Glucose (mg/dl)	84.5	101	112	87.4
Urea (mg/dl)	18.0	21.2	8.8	46.0
Creatinine (mg/dl)	1.1	0.6	0.88	1.62
Total Protein (g/dl)	6.7	7.7	7.4	4.5
Albumin (g/dl)	3.2	2.7	2.4	2.5
Total Bilirubin (mg/dl)	0.9	0.7	0.31	0.41
Direct Bilirubin (mg/dl)	0.66	0.5	0.3	0.37
Cholesterol (mg/dl)	331	117	145	223
Triglycerides (mg/dl)	125	98	59	77
ALP (IU/L)	61.5	322.6	347.8	370.0
ALT (IU/L)	65.7	198.9	448.5	292.0
AST (IU/L)	102.6	212.2	196.7	337.8
GGT (IU/L)	5.0	22.3	14.0	8.0
Creatine Kinase (IU/L)	214	188	311.0	197
LDH (IU/L)	55	41	42.0	240.0
TIBC (µg/dl)	317.0	413.9	214.5	246.1
Total Calcium (mg/dl)	11.2	10.1	10.1	7.1
Copper (mg/dl)	Not measured	0.07	0.05	0.04
Ammonia(µmol/l)	0.92	0.81	0.88	0.73
Pre-prandial bile acid concentration(µmol/l)	6.8	5.4	6.6	5.7
Post-prandial bile acids concentration (µmol/l)	38.8	40.1	42.3	41.1
Total Protein (fluid) (g/dl)	1.0	1.1	0.9	0.1
Fluid Cytology and Microbiological Culture	No bacteria. Hypocellularity. Negative Microbiological culture.			

Reference Ranges: Glucose: 65-118mg/dl; Urea: 15-59.9mg/dl; Creatinine:0.5-1.5mg/dl; Total Protein: 5.4-7.1g/dl; Albumin: 3.1-4g/dl; Total Bilirubin: 0.1-0.3mg/dl; Cholesterol: 92-324mg/dl; Triglycerides: 29-291mg/dl; ALP: 20-156U/L; ALT: 21-102U/L; AST: 23-66U/L; GGT: 6-28U/L; Creatine Kinase: 0-200U/L; LDH: 45-233U/L; TIBC (Total iron binding capacity): 235-495µg/dl), Total Calcium: 9-11.3mg/dl; Copper: 0.1-0.2mg/dl; Ammonia: 0-0.68µmol/l; Pre-prandial Bile Acid Concentration: 0-0.5µmol/l; Post-prandial Bile Acid Concentration: <12µmol/l.

Table 4. Detailed ingredients of the dry pet food

Ingredients	Adult Dry Pet Food	Puppy Dry Pet Food
Moisture (%)	7,00	6,70
Crude Protein (%)	26,00	25,00
Crude Fiber (%)	1,90	2,00
Ether Extract (%)	17,50	18,20
Crude Ash (%)	7,05	7,30
Metabolic Energy (Kcal/kg)	3570	3590
Microbiology Lab.	No growth of any pathogenic bacteria or fungi. No evidence of Mycotoxins or aflatoxins exposure	

DISCUSSION and CONCLUSION

Fibrosis, generally indicates irreversible liver damage. Chronic hepatopathies in human and veterinary patients ultimately lead to fibrosis. End-

stage liver disease is associated with nodule formation, organ contraction and fibrosis. The complications of this stage include metabolic dysfunction, ascites, portal hypertension and hepatic encephalopathy (Brown et al. 2010, Eulenberg and Lidbury 2018). Histopathologically, hepatic fibrosis (HF) has been known as an increase in ECM in liver tissue. Under chronic or repetitive injuries, ECM is produced by hepatocytes, sinusoidal endothelial cells, kupffer cells and stellate cells (Freidman 2000). Lipocytes (Ito cells or stellate cells) located in dissepimental space cause a decrease in ultrafiltration between the sinusoidal blood and hepatocytes by ECM, cytokines and collagen production (Center 1999). Progression of ECM pathology causes also hypertension and ascites. Therefore, anorexia and severe lethargy in dogs result from the progression of ascites and dehydration.

In these cases presented here German Shepherd dogs referred to hospital with the progressive ascites and portal hypertension. Making the diagnosis before 2 years of age showed that hepatic fibrosis in these dogs would be congenital and juvenile. Histopathologically, the substantial compensatory fibrous connective tissue bundles bridging between two adjacent triad and formed parenchymal nodules were reported in all dogs. Rutger et al. 1993 diagnosed idiopathic hepatic fibrosis by liver biopsy in 15 young dogs, of which 9 were German Shepherd Dogs. In the study previously described (Rutger et al. 1993), clinical signs including progressive ascites, dehydration, anorexia and weight loss (except hepatic encephalopathy) in cases with idiopathic hepatic fibrosis were consistent with the report presented here.

Microcytosis, hypoproteinaemia, increased serum activities of ALP and ALT have been described in dogs with hepatic fibrosis (Rutger et al. 1993). In the study of Rutger et al. 1993, fasting blood ammonia and serum bile acid concentrations were increased in most dogs examined. In a study reported by Thornburg 2000, the serum copper levels in dogs were within normal reference range. In this study, the results of complete blood count revealed microcytosis in all dogs and neutrophilic leukocytosis in some cases (case 3 and 4). Fever in case 3 and 4 with cholecystitis were taken under control with antibiotic therapy. Hypoproteinemia, hyperbilirubinemia, increased ammonia, pre and post prandial bile acids concentrations and ALT,

ALP, AST and GGT levels were consistent with the report previously described (Rutger et al. 1993). In the study reported by Desmet 1998, refractory hyperbilirubinemia in hepatic fibrosis was strongly dependent on some stages of biliary fibrosis. In the cases presented here (in generally young dogs) cholecystitis and hyperbilirubinemia was clearly dependent on fibrous connective tissue bundles bridging between two adjacent triad.

Analysis of intraabdominal fluid in all dogs revealed low protein levels (less than 2.5 mg/dl) and hypocellularity (some neutrophils and lymphocytes) without any bacteria. This result was the same with the reports of Owczarczak 2010, Rutger et al. 1993 and James et al. 2008.

The prognosis of Hepatic Fibrosis is controversial. According to Favier 2009 etiology-based treatments for canine (chronic) hepatitis can provide a better prognosis.

In other study (James et al. 2008), poor prognosis in dogs with idiopathic hepatic fibrosis has been reported. In the same study to use of prognostic indicators such as histological, imaging and biochemical profiles were not useful (James et al. 2008). In the study of Rutger et al. 1993, while seven dogs died or euthanized after diagnosis, only one dog were alive during two years. Three dogs were also alive more than four years after the initial diagnosis (Rutger et al. 1993). All the dogs died after 63 days in spite of aggressive and supportive treatment. Surgical cholecystectomy did not also improve the survival in case 2.

In conclusion, several publications and case reports were discussed about congenital predisposition or possibility of idiopathic condition in canine hepatic fibrosis. The cases presented here reflect the congenital condition of idiopathic hepatic fibrosis in young German Shepherd Dogs with histopathological evidence. In the study of Rutger et al. 1993, the dogs of idiopathic hepatic fibrosis were also young and prognosis of the dogs were similar to our cases. However, there was evidence of familial relationship in the cases presented here. Two generation of the same parents showed clinical signs of idiopathic hepatic fibrosis in the age of below 2 year-old. Although the study reflects the possibility of congenital condition of the disease further research about familial relationship in German Shepherd Dogs is required.

ACKNOWLEDGEMENT

Special thanks to *Dr. Hasan Basri ŞENER* for the evaluation of pathological smears and *Dr. Yusuf Şen* for the support of abdominal ultrasonography of the cases.

REFERENCES

- Brown DL, Winkle TV, Cecere T, Rushton S, Brachelente C, Cullen JM.** Congenital hepatic fibrosis in 5 Dogs. *Vet Pathol.* 2010; 47: 102-107.
- Desmet V.** What is congenital hepatic fibrosis? *Histopathol.* 1998; 20: 465–477.
- Center SA.** Chronic liver disease: Current concepts of disease mechanisms. *JSAP.* 1999; 40: 106-114.
- Eulenberg VM, Lidbury JA.** Hepatic fibrosis in dogs. *J Vet Intern Med.* 2018; 32: 26-41.
- Favier RP.** Idiopathic hepatitis and cirrhosis in dogs. *Vet Clin North Am: Smal An Pract.* 2009; 39; 481-488.
- Friedman S L.** Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem,* 2000: 275(4); 2247-2250.
- James FE, Knowles GW, Mansfield CS, Robertson ID.** Ascites due to pre-sinusoidal portal hypertension in dogs: a retrospective analysis of 17 cases. *AVJ,* 2008; 86: 180-186.
- Owczarczak S.** Chronic Hepatic Fibrosis in an 8 year old French Bulldog. Seminar Paper, Cornell University College of Veterinary Medicine, USA, 2010.
- Rutger HC, Haywood S, Kelly DF.** Idiopathic hepatic fibrosis in 15 dogs. *Vet Record.* 1993; 133; 115-118.
- Thornburg LP.** A perspective on copper and liver disease in the dog. *J Vet Diagnostic Invest.* 2000; 12: 101–110.

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 be 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.