

ARAŞTIRMA MAKALELERİ / RESEARCH ARTICLES

**Kızılırmak Deltası'nda İlbahar ve Sonbaharda Yakalanan Karatavuklarda (*Turdus merula*)
Biyometrik Ölçümlerin Değerlendirilmesi** 202
Evaluation of Biometric Measurements in the Blackbirds (*Turdus merula*) Caught in Spring and
Autumn at the Kızılırmak Delta
A. GÜRİSOY ERGEN

**Kitosan-Gümüş Nanopartikülü ve Kitosan-Gümüş-Grafen Oksit Nanokompozitinin Sentezi,
Karakterizasyonu ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi** 208
Synthesis and Characterization of Chitosan-Silver Nanoparticle and Chitosan-Silver-Graphene
Oxide Nanocomposite with Their Determination of Antimicrobial Activities
D. ONBAŞLI, G. YUVALI ÇELİK, G. D. DURBİLMEZ, İ. ÖÇSOY

Use of Fascia Lata Autograft for Augmentation of Bladder in Rabbits 216
Tavşanlarda İdrar Kesesi Ogmentasyonunda Otojen Fasya Lata Greftinin Kullanımı
M. K. YÖNEZ, G. ATALAN

**Kayseri Develi Tarımsal Kalkınma Kooperatifi Süt Sığırı Çiftliğinde Bulunan Sığır
Tırnaklarının Muayenesi ve Problemlili Tırnakların Sağıltımı** 222
Examination of the Cattle Foot in the Kayseri Develi Agricultural Milking Farm and Treatment of Foot Disorders
B. PİRCİ, G. ATALAN

Antioxidant Effects of Pomegranate Seed Oil Against Pentachlorophenol Toxicity in Rat Tissues 230
Rat Dokularında Pentaklorofenol Toksisitesine Karşı Nar Çekirdeği Yağının Antioksidan Etkileri
Z. SOYER SARICA, M. KARABACAK, M. KANBUR, G. ERASLAN, B. C. LİMAN, M. Y. TEKELİ

Düşük Doz Capsaicin Uygulanan Sıçanların Ovaryumlarında TGF-Beta 1'in İmmunohistokimyasal Yerleşimi. 238
Immunohistochemical Localization of TGF-Beta1 in Low Dose Capsaicin Treated Rat Ovary
C. G. ÖZGÜDEN AKKOÇ, E. D. ASMAZ, T. İLHAN, B. ZİK

Determination of Some Antibiotic Residues by HPLC Method in Chicken Meats Prepared for Consumption.. 247
Tüketime Sunulan Tavuk Etlerindeki Bazı Antibiyotik Kalıntılarının HPLC Yöntemi ile Belirlenmesi
E. ARSLANBAŞ, S. ŞAHİN, R. KALIN, M. N. MOĞULKOÇ, H. GÜNGÖR

DERLEMELER / REVIEW ARTICLES

Balık Tüberkülozunda Tedavi..... 253
Treatment in Fish Tuberculosis
B. BAŞ, H. TÜTÜN, L. ALTINTAŞ

Veteriner Dermatolojide Ultrason Kullanımı..... 258
Use of Ultrasound in Veterinary Dermatology
D. TARHAN, O. İSKEFLİ, L. KOENHEMSİ, M. E. OR, Ü. B. BARUTÇU

Gıdalarda Kimyasal Kalıntılar ve Analiz Metotları..... 264
Chemical Residues and Analysis Methods in Foods
Y. DOĞAN, F. KOÇ

OLGU SUNUMLARI / CASE REPORTS

A Case of Atresia Ani in an Anatolian Water Buffalo Calf..... 271
Bir Anadolu Manda Buzağısında Atrezia Ani Olgusu
K. VAROL, G. ATALAN, V. GÜNES, U. ALPMAN, M. K. YÖNEZ

Kedilerde Cheyletiellosis ve Selamectin Damla ile Sağıltımı..... 276
Cheyletiellosis in Cats and Its Treatment with Selamectin Drop
U. F. KORKMAZ, S. GÖKPINAR



ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ
Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University

Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University

15(3): 202-278, 2018

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi

ISSN-1304-7280

Yıl/Year: 2018
Cilt/Volume: 15
Sayı/Number: 3

Yılda 3 sayı yayımlanır / Published 3 issues per year
<http://ercivet.erciyes.edu.tr>
E-posta: ercvet@gmail.com



ISSN-1304-7280

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi

Journal of Faculty of Veterinary Medicine,
Erciyes University

Yılda 3 sayı yayımlanır
Published 3 issues per year

Bu dergi EBSCO Host, CAB Abstracts, Global Health, Tübitak-Ulakbim TR Dizin ve Türkiye Atıf Dizini tarafından dizinlenmektedir.

This journal is reviewed by EBSCO Host, CAB Abstracts, Global Health, Tubitak-Ulakbim TR Dizin and Turkey Citation Index.

Yıl / Year : 2018
Cilt / Volume : 15
Sayı / Number : 3

<http://ercivet.erciyes.edu.tr>
E-posta: ercvet@gmail.com

Baskı Tarihi: Aralık 2018

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi
Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University
Yılda 3 sayı yayımlanır
Published 3 issues per year

Sahibi / Owner

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Adına
Prof. Dr. Abdullah İNCİ (Dekan)

Editörler Kurulu / Editorial Board

Baş Editör / Editor-in Chief

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Editör Kurul Üyeleri / Editorial Board

Prof. Dr. Güner KÜÇÜK BAYRAM (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Berrin KOCAOĞLU GÜÇLÜ (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Öznur ASLAN (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Doç. Dr. Seçil ABAY (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Doç. Dr. Aytaç AKÇAY (İstatistik) (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Doç. Dr. Emel ALAN (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Doç. Dr. Kanber KARA (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Dr. Öğr. Üyesi Serhat AL (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Dr. Öğr. Üyesi Fatih Doğan KOCA (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

Arş. Gör. İmdat ORHAN (Erciyes Üniv. Vet. Fak.)

İngilizce Dil Danışmanı/ Language Editor

Okt. Mustafa AKGÜL (Erciyes Üniv. Yabancı Diller YO.)

Danışma Kurulu / Advisory Board

Prof. Dr. Rene van den HOVEN (University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria)

Prof. Dr. Thomas WITTEK (University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria)

Prof. Dr. Thomas RÜLICHE (University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria)

Prof. Dr. Askarbek TÛLÖBAEV (Manas Üniv. Vet. Fak. Bişkek, Kırgızistan)

Prof. Dr. Aytekin GÜNLÜ (Selçuk Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Nuh KILIÇ (Adnan Menderes Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. İsa ÖZAYDIN (Kafkas Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Güven KAŞIKÇI (İstanbul Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Mahmut OK (Selçuk Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Ender YARSAN (Ankara Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Abdurrahman AKSOY (Ondokuz Mayıs Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Münir AKTAŞ (Fırat Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Gürkan UÇAR (Selçuk Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Murat YILDIRIM (Kırıkkale Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Levent ERGÜN (Ankara Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Murat YALÇIN (Uludağ Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Aşkın YAŞAR (Selçuk Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Ali BAHADIR (Uludağ Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Cavit ARSLAN (Selçuk Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Alparslan Kadir DEVRİM (Kırıkkale Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Mustafa SAATÇI (Muğla Sıtkı Koçman Üniv. Ziraat Fak.)

Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN (Selçuk Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. M. Özgür ÖZYİĞİT (Uludağ Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Kadir YEŞİLBAĞ (Uludağ Üniv. Vet. Fak.)

Prof. Dr. Funda KIRAL (Adnan Menderes Üniv. Vet. Fak.)

Yazışma Adresi / Correspondence

Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Dergisi Editörlüğü
38039-Kayseri / TÜRKİYE

<http://ercivet.erciyes.edu.tr>

E-posta : ercivet@gmail.com

Tel : 0 352 339 94 84

Fax : 0 352 337 27 40

Yayın Türü / Publication Type: Yaygın süreli ve hakemli/ Common term and peer reviewed

Mizanpaj / Designer: Erhan GÜMÜŞ

Basım / Print: Erciyes Üniversitesi Matbaası, Melikgazi/KAYSERİ

ISSN-1304-728

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

Sayfa / Page

ARAŞTIRMA MAKALELERİ / RESEARCH ARTICLES

- Kızılırmak Deltası'nda İlkbahar ve Sonbaharda Yakalanan Karatavuklarda (*Turdus merula*) Biyometrik Ölçümlerin Değerlendirilmesi** 202
Evaluation of Biometric Measurements in the Blackbirds (*Turdus merula*) Caught in Spring and Autumn at the Kızılırmak Delta
A. GÜRİSOY ERGEN
- Kitosan-Gümüş Nanopartikülü ve Kitosan-Gümüş-Grafen Oksit Nanokompozitinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi** 208
Synthesis and Characterization of Chitosan-Silver Nanoparticle and Chitosan-Silver-Graphene Oxide Nanocomposite with Their Determination of Antimicrobial Activities
D. ONBAŞLI, G. YUVALI ÇELİK, G. D. DURBİLMEZ, İ. ÖÇSOY
- Use of Fascia Lata Autograft for Augmentation of Bladder in Rabbits** 216
Tavşanlarda İdrar Kesesi Ogmentasyonunda Otojen Fasya Lata Greftinin Kullanımı
M. K. YÖNEZ, G. ATALAN
- Kayseri Develi Tarımsal Kalkınma Kooperatifi Süt Sığırı Çiftliğinde Bulunan Sığır Tırnaklarının Muayenesi ve Problemlili Tırnakların Sağaltımı**..... 222
Examination of the Cattle Foot in the Kayseri Develi Agricultural Milking Farm and Treatment of Foot Disorders
B. PİRÇİ, G. ATALAN
- Antioxidant Effects of Pomegranate Seed Oil Against Pentachlorophenol Toxicity in Rat Tissues** 230
Rat Dokularında Pentaklorofenol Toksisitesine Karşı Nar Çekirdeği Yağının Antioksidan Etkileri
Z. SOYER SARICA, M. KARABACAK, M. KANBUR, G. ERASLAN, B. C. LİMAN, M. Y. TEKELİ
- Düşük Doz Capsaicin Uygulanan Sıçanların Ovaryumlarında TGF-Beta 1'in İmmunohistokimyasal Yerleşimi.** 238
Immunohistochemical Localization of TGF-Beta1 in Low Dose Capsaicin Treated Rat Ovary
C. G. ÖZGÜDEN AKKOÇ, E. D. ASMAZ, T. İLHAN, B. ZİK
- Determination of Some Antibiotic Residues by HPLC Method in Chicken Meats Prepared for Consumption..** 247
Tüketime Sunulan Tavuk Etlerindeki Bazı Antibiyotik Kalıntılarının HPLC Yöntemi ile Belirlenmesi
E. ARSLANBAŞ, S. ŞAHİN, R. KALIN, M. N. MOĞULKOÇ, H. GÜNGÖR

DERLEMELER / REVIEW ARTICLES

- Balık Tüberkülozunda Tedavi**..... 253
Treatment in Fish Tuberculosis
B. BAŞ, H. TÜTÜN, L. ALTINTAŞ
- Veteriner Dermatolojide Ultrason Kullanımı**..... 258
Use of Ultrasound in Veterinary Dermatology
D. TARHAN, O. İSKEFLİ, L. KOENHEMSİ, M. E. OR, Ü. B. BARUTÇU
- Gıdalarda Kimyasal Kalıntılar ve Analiz Metotları**..... 264
Chemical Residues and Analysis Methods in Foods
Y. DOĞAN, F. KOÇ

OLGU SUNUMLARI / CASE REPORTS

- A Case of Atresia Ani in an Anatolian Water Buffalo Calf**..... 271
Bir Anadolu Manda Buzağısında Atrezia Ani Olgusu
K. VAROL, G. ATALAN, V. GÜNES, U. ALPMAN, M. K. YÖNEZ
- Kedilerde Cheyletiellosis ve Selamektin Damla ile Sağaltımı**.....276
Cheyletiellosis in Cats and Its Treatment with Selamectin Drop
U. F. KORKMAZ, S. GÖKPINAR



**Kızılırmak Deltası'nda İlkbahar ve Sonbaharda Yakalanan Karatavuklarda (*Turdus merula*)
Biyometrik Ölçümlerin Değerlendirilmesi**

Arzu GÜR SOY ERGEN^{1,2}

¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Samsun-TÜRKİYE

²Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Ankara-TÜRKİYE

Özet: Bu çalışmada Türkiye'de biyometrisi daha önce detaylı çalışılmamış *Turdus merula*'nın biyometrisinin cinsiyete ve mevsime bağlı olarak farklılık gösterip göstermediği araştırılmış ve taksonomik durumu açıklığa kavuşturulmaya çalışılmıştır. Kızılırmak Deltası'nda 2002-2009 yılları arasında ilkbahar ve sonbahar göç döneminde yakalanan *T. merula* örneklerinin kanat ve kuyruk uzunluğu ile ağırlıkları ölçülmüştür. Sekiz yıllık çalışma süresince ilkbaharda 423, sonbaharda 421 *T. merula* yakalanıp halkalanmış ve biyometrik ölçümleri alınmıştır. Türkiye'de *T. merula*'nın iki alttürü tespit edilmiştir. Bunlar *Turdus merula aterrimus* ve *Turdus merula syriacus*'tur. Bu alttürler, kanat uzunluğu ile birbirlerinden ayrılmaktadırlar. Kızılırmak Deltası'nda yakalanan *T. merula*'nın kanat uzunluğu ve kuyruk uzunluğu ortalaması *Turdus merula aterrimus*'un Kuzey Batı Anadolu örnekleri ile örtüşürken Kuzey Doğu Anadolu örneklerinden daha uzundur. Mevsimi dikkate almaksızın değerlendirdiğimizde de hem dişilerin hem de erkeklerin kanat uzunlukları ortalaması *T. m. aterrimus* alttürünün uzunlukları ile örtüşmektedir. Kızılırmak Deltası'nda yakalanan örneklerin kanat ve kuyruk uzunluğu ortalaması ile ağırlık ortalaması *T. m. aterrimus* alttürü ile örtüşmektedir. Kızılırmak Deltası'nda yapılan bu çalışma, bu takson üzerinde yapılmış örnek sayısı bakımından Türkiye'deki en detaylı biyometrik çalışma olup *T. merula* alttürlerinin morfolojik açıdan taksonomik durumlarına açıklık getirilmeye çalışılmıştır.

Anahtar kelimeler: Biyometri, Kızılırmak Deltası, kuş halkalama, *Turdus merula*

Evaluation of Biometric Measurements in the Blackbirds (*Turdus merula*) Caught in Spring and Autumn at the Kızılırmak Delta

Summary: Through this study, it was investigated whether the biometry of *Turdus merula*, the biometry of which was not studied in a detailed manner in Turkey, shows differences depending on sex and seasons. The wing, tail length and weight of *T. merula* caught in Kızılırmak Delta during spring and autumn ringing periods between 2002 and 2009 were measured. During the eight year ringing season, 423 *T. merula* in spring and 421 in autumn were caught and ringed and biometric measurements were taken. Both wing length and tail length average of the *T. m. aterrimus* overlap with the samples of the North West Anatolia whereas it is longer than the samples of the North East Anatolia. Regardless of the season, the mean wing length of both the females and the males overlap with the lengths of the *T. m. aterrimus*. The mean of the wing, tail length and weight of the samples caught in Kızılırmak Delta overlap with *T. m. aterrimus* subspecies. This study aimed to identify the taxonomy among *T. merula* subspecies was first and the most detailed study on biometrics in terms of sample size in Kızılırmak Delta in Turkey.

Key words: Biometrics, bird ringing, Kızılırmak Delta, *T. merula*

Giriş

Tür içi morfolojik değişkenlik aralığı, farklı popülasyonların tanımlanması için kullanılan temel parametrelerden birisidir. Morfolojik parametrelerin istatistiksel analizi yapılarak bir türün popülasyonları arasındaki farklılaşmayı tanımlamak mümkündür (5,31). Kuşlardan alınan biyometrik ölçümler, çeşitli coğrafi bölgelerdeki popülasyonlar arasında var olan temel farklılıkların belirlenmesinde, özellikle de taksonomik, fizyolojik,

ekolojik ve evrimsel çalışmalarda önemli bir yer tutmaktadır (12,20).

Palearktik'te yaygın olan *Turdus merula* politipik özellikte bir tür olarak kabul edilmektedir (8,10). Palearktik bölgede *T. m. merula* (nominant alttür), *T. m. azorensis*, *T. m. cabrae*, *T. m. mauritanicus*, *T. m. aterrimus*, *T. m. syriacus* ve *T. m. intermedius* olmak üzere yedi alttürü bulunur ve alttürler birbirinden kanat uzunluğu ve tüylerin (giysi) renk farkına göre ayrılır (8,10,19,28). Bu alttürlerden *T. m. aterrimus* Türkiye'nin kuzey, batı ve güneyinde yayılış gösterirken güneydeki kıyasal alanlarda *T. m. syriacus* bulunur (10,19,23). Bu alttürler arasındaki ayrımlar biyometrik ölçümlere ve vücut rengindeki farklılıklara dayanmaktadır (10). *T. merula*'nın ekolojisi ve

Geliş Tarihi/Submission Date : 18.04.2017

Kabul Tarihi/Accepted Date : 07.11.2017

Bu çalışma "Karadeniz kıyısında passerin (Passeriformes) göçünün dinamikleri, OMÜ-BAP, Proje No:F-362" ve "Cerneke Halkalama İstasyonunda Sylvidae (Aves: Passeriformes) familyasının göç dinamikleri ve oriyantasyonları, OMÜ-BAP, Proje No: F-478 " projeleri ile desteklenmiştir.

biyometrisi pek çok Avrupa ülkesinde çalışılmıştır (9,16) ancak çok yaygın bir tür olmasına rağmen Türkiye’de biyometrik ölçümleri ile ilgili bugüne kadar detaylı bir çalışma yapılmamıştır. Türkiye’de bulunan bu iki alttür hakkında biyometrik bilgi oldukça azdır ve az sayıda örneğe dayanmaktadır.

Tür ya da alttürlerin coğrafi dağılımlarının bilinmesi, evrim, ekoloji ve taksonomi gibi biyolojinin farklı alanlarında yapılan çalışmalarda oldukça önem arz etmektedir (21). Bu nedenlerle Türkiye’de biyometrisi daha önce ayrıntılı çalışılmamış *T.merula* örnekleri üzerinde kanat ve kuyruk uzunlukları ile ağırlığının cinsiyet ve mevsime bağlı farklılıklarını belirleyerek türün taksonomisine açıklık getirmek amacıyla bu çalışma ele alınmıştır.

Gereç ve Yöntem

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ornitoloji Araştırma Merkezi’nin Cernek Halkalama İstasyonu’nda yürüttüğü halkalama çalışmaları, her sene yaklaşık olarak aynı tarihlerde gerçekleşmektedir. Halkalama çalışmaları ilkbahar döneminde 15 Mart-31 Mayıs, Sonbahar döneminde ise 15 Ağustos-31 Ekim tarihleri arasında devam etmektedir. Bu çalışmada kullanılan veriler, Samsun il sınırları içerisinde bulunan Kızılırmak Deltası’nda Cernek Gölü (K 41,643188; D 36,084030) kıyısındaki Cernek Halkalama İstasyonu’nda 2002-2009 yılları arasında elde edilmiştir.

Çalışma alanı

Kızılırmak Deltası, 56 000 hektarlık bir alana sahip olup, bu alanın 12 000 hektarı sulak alandır. Deniz, ırmak, göl, sazlık, bataklık, çayır, mera, orman, kumul ve tarım alanları gibi farklı yaşam alanlarını bir arada bulundurması ve uy-

gun iklim şartlarına sahip olması sebebiyle önemli ölçüde biyolojik çeşitliliğe sahiptir (3,13,30).

Yöntem

Bu çalışmada, sis ağı ağırları kullanıldı. Göz açıklığı 16x16 mm veya 25x25 mm olup, dört raftan oluşur. 7 m ve 12 m olmak üzere iki farklı ağ uzunluğu kullanıldı. Ağlar, kuşların ana hareket yönüne dik ve denize paralel yerleştirildi. Göze çarpan çalılar önüne, arkasına, iki çalı arasında, ağaç ya da çalı patikaları boyuna ve böğürtlenlerin olduğu yerlere tek başına veya birbirine bağlı ağ sırası şeklinde kuruldu. Ağlar, Güney Doğu Avrupa Kuş Göç Ağı (SEEN) metodolojisine göre gün doğumundan gün batımına kadar tüm gün açık bırakıldı ve periyodik olarak her saat başı kontrol edildi (6).

Kuşlar, ağlardan kontrollü bir şekilde kavranarak çıkartılıp, yakalanan kuşlar, yumuşak, hava alabilen, uygun boyutlarda bez torbalara birer tane olmak üzere koyuldu. Güneş ışığından uzakta, sessiz bir ortamda bekletilen kuşlar en geç bir saat içerisinde halkalandı ve ölçümleri yapıldı.

Kuşların ayaklarına, Ulusal Halkalama Programı tarafından temin edilen alüminyum halkalar takıldı. 4.2 mm çapında DA halkaları kullanıldı. Her halka üzerinde ayrı bir kod numarası ve standart bir adres yer alır. Halka takıldıktan sonra sırasıyla yağ skoru, yaşı, cinsiyeti ve kanat formülü belirlendi, kanat uzunluğu, kuyruk uzunluğu ve ağırlığı ölçüldü. Ağırlık 0.1 g hassasiyetli terazi ile ölçüldü. Ölçümler ve değerlendirme Busse (6)’ye göre yapıldı. Alınan tüm bu ölçüler özel kayıt defterlerine işlendi. Bireylerin tür teşhisleri Svensson (29)’a göre yapıldı.

Tablo 1. İlkbahar ve sonbahar göç döneminde, 2002–2009 yılları arasında halkalanan dişi (♀) ve erkek (♂) *Turdus merula* sayısı

	İlkbahar			Sonbahar		
	♀	♂	Toplam	♀	♂	Toplam
2002	19	7	26	46	28	74
2003	37	14	51	67	43	110
2004	65	23	88	17	15	32
2005	72	26	98	26	23	49
2006	20	7	27	11	10	21
2007	43	15	58	4	11	15
2008	23	10	33	34	27	61
2009	31	11	42	31	28	59
Toplam	310	113	423	236	185	421

Veri analizi

İstatistiksel analizler ve karşılaştırmalar SPSS 22 paket programı ile %99 güven düzeyinde ($\alpha=0.01$) yapıldı. *T. merula*'nın kuyruk ve kanat uzunlukları ile ağırlığının; mevsim, yaş ve cinsiyet değişkenlerine göre farklı olup olmadıkları bağımsız t-testi ile analiz edildi (14).

Bulgular

2002-2009 yılları arasında, sekiz yıllık halkalama sezonu boyunca ilkbaharda 423, sonbaharda 421 *T. merula* örneği yakalanıp halkalandı ve biyometrik ölçümleri alındı (Tablo 1). Cinsiyet, yaş ve mevsime bağlı kalmaksızın *T. merula*'nın kanat uzunluğu ortalaması ile standart hatası 126.84±0.12 mm (n=809), kuyruk uzunluğu ortalaması ile standart hatası

105.44±0.17 mm (n=794) ve ağırlık ortalaması ile standart hatası 82.05±0.22 g (n=828) olarak bulunmuştur (Tablo 2).

İlkbaharda *T. merula*'da en kısa kanat uzunluğu 116 mm, en uzun kanat uzunluğu 136 mm, sonbaharda en kısa kanat uzunluğu 118 mm, en uzun kanat uzunluğu 137 mm'dir (Tablo 2,3). İlkbaharda dişilerin (n=289) kanat uzunlukları ortalaması ve standart hatası 125.56±0.45 mm, erkeklerin (n=98) kanat uzunlukları ortalaması ve standart hatası ise 129.29±0.39 mm'dir. Sonbaharda dişilerin (n=230) kanat uzunlukları ortalaması ve standart hatası 125.38±0.27 mm, erkeklerin (n=180) kanat uzunlukları ortalaması ve standart hatası ise 129.38±0.27 mm'dir (Tablo 3).

Tablo 2. *Turdus merula*'nın 2002-2009 yıllarına ait ölçümleri

	N	Minimum	Maksimum	($\bar{x}\pm S.h.$)
Kanat uzunluğu (mm)	809	116	137	126.84±0.12
Kuyruk uzunluğu (mm)	794	92	120	105.44±0.17
Ağırlık (g)	828	61.7	105	82.05±0.22

Tablo 3. *Turdus merula*'nın 2002-2009 yıllarına ait cinsiyet ve mevsime göre ölçümleri

	♀		♂	
	İlkbahar ($\bar{x}\pm S.h.$)	Sonbahar ($\bar{x}\pm S.h.$)	İlkbahar ($\bar{x}\pm S.h.$)	Sonbahar ($\bar{x}\pm S.h.$)
Kanat uzunluğu (mm)	125.56±0.45	125.38±0.27	129.29±0.39	129.38±0.27
Kuyruk uzunluğu (mm)	104.72±0.47	104.11±0.30	107.71±0.70	106.63±0.35
Ağırlık (g)	82.19±0.49	80.38±0.33	83.42±0.43	83.25±0.37

Tablo 4. *Turdus merula*'nın 2002-2009 yıllarına ait mevsime, yaşa ve cinsiyete göre ölçümlerinin ortalaması (g) ($\pm S.h.$). T-testi istatistikleri ve p değeri.

		Kanat uzunluğu (mm)	Kuyruk uzunluğu (mm)	Ağırlık (g)
Cinsiyet		t=8.566 p=0.000*	t=2.38 p=0.009*	t=3.932 p=0.000*
	Dişi ($\bar{x}\pm S.h.$)	126.04±0.27	104.33±0.30	80.90±0.33
	Erkek ($\bar{x}\pm S.h.$)	129.64±0.32	105.69±0.49	82.93±0.40
Yaş		t=3.023 p=0.001*	t=3.380 p=0.000*	t=1.707 p=0.261
	Ergin ($\bar{x}\pm S.h.$)	127.87±0.31	105.45±0.47	81.92±0.52
	Genç ($\bar{x}\pm S.h.$)	126.65±0.26	103.47±0.34	80.89±0.31
Mevsim		t=3.350 p=0.009*	t=0.057 p=0.326	t=0.873 p=0.070
	Sonbahar ($\bar{x}\pm S.h.$)	127.03±0.21	105.01±0.29	81.51±0.32
	İlkbahar ($\bar{x}\pm S.h.$)	127.18±0.38	103.31±0.48	81.05±0.41

İlkbaharda *T. merula*'da en kısa kuyruk uzunluğu 93 mm, en uzun kuyruk uzunluğu 120 mm, sonbaharda en kısa kuyruk uzunluğu 92 mm, en uzun kuyruk uzunluğu 119 mm'dir (Tablo 2). İlkbaharda dişilerin (n=284) kuyruk uzunlukları ortalaması ve standart hatası 104.72±0.47 mm, erkeklerin (n=98) kuyruk uzunlukları ortalaması ve standart hatası ise 107.71±0.70 mm'dir. Sonbaharda dişilerin (n=225) kuyruk uzunlukları ortalaması ve standart hatası 104.11±0.30 mm, erkeklerin (n=178) kuyruk uzunlukları ortalaması ve standart hatası ise 106.63±0.35 mm'dir (Tablo 3).

İlkbaharda en hafif *T. merula* 62.4 g, en ağırı 105 g, sonbaharda 61.7 g ile 100.7 g'dır (Tablo 2,3). İlkbaharda dişilerin (n=292) ağırlıklarının ortalaması ve standart hatası 82.19±0.49 g, erkeklerin (n=99) ağırlıklarının ortalaması ve standart hatası ise 83.42±0.43 g'dır. Sonbaharda dişilerin (n=234) ağırlıklarının ortalaması ve standart hatası 80.38±0.33 g, erkeklerin (n=182) ağırlıklarının ortalaması ve standart hatası ise 83.25±0.37 g'dır (Tablo 3).

Karşılaştırmalı İstatistikler

Çalışmada mevsim, yaş ve cinsiyete ait ikişer grup bulunmaktadır. Bu gruplara ait normallik testi yapılmış ve grupların hepsinin normal dağıldığı bulunmuştur. İkili karşılaştırmalar bağımsız t-testi ile yapılmıştır. Kanat ve kuyruk uzunluğu ile ağırlığın mevsime, yaşa ve cinsiyete göre farklılık gösterip göstermediğine bakılmıştır. Buna göre; *T. merula*'da kanat uzunluğu bakımından mevsimlere göre anlamlı bir fark varken (p=0.009), kuyruk uzunluğu (p=0.326) ve ağırlık (p=0.07) bakımından anlamlı bir fark yoktur (Tablo 4). Yaş gruplarına bakıldığında ise *T. merula*'da kanat (p=0.001) ve kuyruk (p=0.000) uzunluğu bakımından anlamlı bir fark bulunmuş, ağırlık bakımından (p=0.261) anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 4). Son olarak değişkenlerin cinsiyete göre farklılık gösterip göstermediğine bakılmış ve üç değişken bakımından cinsiyete göre farklılık bulunmuştur (p=0.000) (Tablo 4).

Tartışma ve Sonuç

Kızılırmak Deltası'ndan elde ettiğimiz verilere göre ilkbahar ve sonbaharda dişilerin kanat uzunlukları ortalaması, Kuzey Batı Anadolu örnekleriyle hemen hemen aynı olmasına rağmen Kuzey Doğu Anadolu ve Toros örneklerinden daha uzun bulunmuştur (23). Yine dişilerin ilkbahar ve sonbahardaki kanat uzunluğu ortalaması, Romanya, Bulgaristan, Yunanistan ve

Transkafkasya örneklerinden hem de İran'ın kuzeyindeki örneklerden de daha uzun bulunmuştur (23,27). Erkeklerin kanat uzunluğu ortalaması hem Kuzey Batı Anadolu hem Kuzey Doğu Anadolu hem de Romanya örnekleriyle hemen hemen aynıken İran'ın kuzeyi, Toroslar ve Güney Doğu Avrupa (eski Yugoslavya'nın güneyi) örneklerinden daha uzundur (8,23). Kızılırmak Deltası'ndan elde ettiğimiz veriler *T. m. aterrimus* alttürünün kanat uzunluğu ortalaması ile örtüşmektedir (8,23). Mevsimi ve yaşı dikkate almaksızın değerlendirdiğimizde de hem dişilerin hem de erkeklerin kanat uzunlukları ortalaması *T. m. aterrimus* alttürünün uzunlukları ile örtüşmektedir (8,23). Kızılırmak Deltası örnekleri, *T. m. syriacus*'un kanat uzunluğundan belirgin şekilde uzun bulunmuştur (8,10,23).

Kızılırmak Deltası'nda elde edilen verilere göre kuyruk uzunluklarının alt ve üst sınırları *T. m. aterrimus*'un ölçümleri ile uyum göstermektedir (10). Kızılırmak Deltası örneklerinin kuyruk uzunlukları arasında mevsime bağlı olarak fark yokken, yaş ve cinsiyete göre fark bulunmuştur. Erkek *T. merula* örnekleri dişilerden, erginler de gençlerden daha uzun kuyruğa sahiptir.

Ağırlıklarına baktığımızda ise göre Şubat ve Temmuz ayları arasında yakalanan dişi (n=5) ve erkek (n=9) *T. m. aterrimus* örneklerinin ortalama ağırlığı Kızılırmak Deltası'nda ilkbahar sezonunda Mart ve Nisan aylarında yakalanan dişi (n=310) ve erkek (n=113) örneklerin ortalama ağırlığından daha fazladır (8). Bu farklılık, Kızılırmak Deltası'nda yakalanan örnek sayısının fazlalığı ve çalışmada elde edilen bulguların daha güvenilir olduğu ile ifade edilebilir. En hafif ve en ağır örnek arasındaki varyasyon oldukça fazladır. Halbuki Clement (8)'in belirttiği örneklerin hem sayısı az hem de ağırlığı fazla olan örneklerdir. Kızılırmak Deltası örneklerinin ağırlıkları arasında mevsime ve yaşa bağlı olarak fark yokken, cinsiyete göre fark bulunmuştur. Toy (*Otis tarda*) dişileri 3.5-5 kg kadar gelirken, erkekler 8-16 kg ağırlığındadır (15). Yine Döğüşkenkuş (*Calidris pugnax*) erkekleri 168-242 g olup dişileri 85-126 g'dır (15). Erkeklerin dişilerden daha iri ve ağır olması erkek-erkek mücadelesinde avantaj sağlamaktadır (1,2,11,24,25) Roselaar (23) ve Clement (8) tarafından yapılan çalışmalarda kullanılan örnek sayısı, Kızılırmak Deltası'ndan elde edilen örnek sayısından belirgin şekilde azdır. Ancak Kızılırmak Deltası örneklerinin kanat, kuyruk uzunluğu ortalaması ve ağırlık ortalaması *T. m. aterrimus* alttürü ile ör-

tüşmektedir.

Bu çalışma sonucunda araştırma alanımız olan Kızılırmak Deltası'nda dokuz yıl boyunca ilkbahar ve sonbahar göç döneminde elde ettiğimiz bulgular, *T. m. aterrimus* alttürü ile örtüşmektedir. Bu sonuçlar, araştırmacıların ileri sürdüğü Türkiye'nin kuzey bölgelerinde *T. m. aterrimus* alttürünün yayılış gösterdiği tezini desteklemektedir.

Kanat uzunluğu bireyden bireye yaş, cinsiyet ve coğrafik orijine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Cramp (9) eşeylerin ağırlık ve büyüklük açısından oldukça benzer olup erkeklerin % 5 daha uzun kanada sahip olduğunu belirtmiştir. Söğütbülbülü (*Phylloscopus trochilus*) erkeklerinin kanat uzunlukları dişiye göre 2-4 mm daha uzun olduğu ifade edilmektedir (29). Kızılırmak Deltası'nda yakalanan *T. merula* örneklerinde de dişiler erkeklere göre %2.5 daha kısa kanat uzunluğu ortalamasına sahipken, dişilerin ağırlıklarının ortalaması erkeklere göre daha azdır. Eşeyler arasındaki farkı ekolojik ayrışma ve eşeyssel seçilim teorileri ile açıklamak mümkündür (2,11,23-25). Ekolojik ayrışma teorisi eşeyler arasındaki büyüklük farkını, farklı niş tercihlerinden dolayı olabileceğini ileri sürerken eşeyssel seçilim teorisi bir eşeydeki vücut büyüklüğünün eş seçimi rekabetinde avantaj sağladığını ileri sürmektedir (2,11,17).

Diğer kuşlarda olduğu gibi biyometrik çalışmalar, *T. merula*'nın dağılımını ve biyolojisini daha iyi anlamak ve koruma çalışmalarını iyileştirmek için yararlı olacaktır.

Hava koşullarındaki uzun dönemli farklılıklar minor seleksiyon etkisi nedeniyle uzun dönemde kanat, kuyruk uzunluğu farkını etkileyebilir. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda iklimsel değişikliklerin tür üzerine etkisi detaylı olarak değerlendirilmelidir.

Teşekkür

Verilerin toplanmasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ornitoloji Araştırma Merkezi'ne, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Cernek Kuş Halkalama İstasyonu'nun deneyimli kuş halkalamacılarına ve Türkiye'nin farklı üniversitelerinden gelen gönüllülere teşekkür ederim.

Kaynaklar

1. Albutra QB, Demayo CG, Torres MAJ. Determination of sexual dimorphism in the primary wing and tail feathers of a subspecies of the rock pigeon (*Columba livia intermedia*) using principal component analysis, elliptic fourier analysis and discriminant anal-

ysis. Second International Conference on Environmental Science and Technology (IPCBEE) 2011; Singapore.

2. Andersson M. Sexual Selection. Princeton New Jersey: Princeton University Press, 1994; p. 624.
3. Barış YS, Erciyas K, Gürsoy A, Özsemir C, Nowakowski JK. Cernek: A new bird ringing station in Turkey. Ring 2005; 27(1): 113-20.
4. Blondel J, Perret P, Anstett MC, Thébaud C. Evolution of sexual size dimorphism in birds: test of hypotheses using blue tits in contrasted Mediterranean habitats. J Evol Biol 2002; 15(3): 440-50.
5. Busse P, Maksalon L. Biometrical variability of song thrushes migrating through Polish Baltic coast. Notatki Ornit 1986; 27(3-4): 105-27.
6. Busse P. Bird Station Manual. University of Gdansk, Choczewo: SE European Bird Migration Network Bird Migration Research Station, 2000; p. 264.
7. Francis CM, Wood DS. Effects of age and wear on wing length of wood warblers. J Field Ornithol 1989; 60(4): 495-503.
8. Clement P, Hathway R. Thrushes. First Edition. London: Christopher Helm, 2001; p. 463.
9. Cramp S. Handbook of the birds of Europe, the Middle East and North Africa: The birds of the Western Palearctic; New York: Oxford University Press, 1988; p. 1084.
10. Collar N. Common Blackbird (*Turdus merula*). del Hoyo J, Elliott JA, Sargatal J, Christie DA and de Juana E. eds. In: Handbook of the Birds of the World Volume 10. Barcelona: Lynx Edicions, 2015; p. 645.
11. Darwin C. The descent of man and selection in relation to sex. Princeton New Jersey: Princeton University Press, 1981; p.475
12. Dunning JB. Handbook of Avian Body Masses. Second Edition. Boca Raton, FL: CRC Press Inc, 2007; p. 655.
13. Eken G, Bozdoğan M, İsfendiyaroğlu S, Kılıç T, Lise Y. Türkiye'nin Önemli Doğa Alanları. Birinci Baskı. Ankara; Doğa Derneği, 2006; s. 1112.
14. Erilli NA. İstatistik-II. Ankara: Seçkin Yayıncılık, 2015; s. 296.
15. del Hoyo J, Elliott JA, Sargatal J, Christie DA and de Juana E, eds. Handbook of the Birds of the World Alive. Barcelona: Lynx Edicions, 2015; p. 895.

16. Glutz von Blotzheim UN, Bauer KM. Handbuch der Vogel Mitteleuropas. Passeriformes (II). First Edition. Wiesbaden: Aula-Verlag, 1985; p. 814.
17. Gutiérrez Corchero F, Campos F, Hernández MA, Amezcua A. Biometrics of the Southern Grey Shrike *Lanius meridionalis* in relation to age and sex. Ringing and Migration 2007; 23(3): 141-6.
18. Karubian J, Swaddle JP. Selection on females can create larger males. Proc R Soc Lond B 2001; 268(1468): 725-28.
19. Kirwan GM, Boyla KA, Castell P, Demirci B, Özen M, Welch H, Marlow T. The Birds of Turkey. First Edition. London: Christopher Helm, 2008; p. 512.
20. Miller SL, Gregg MA, Kuritsubo AR, Combs SM, Murdock MK, Nilsson JA, Noon BR, Botzler RG. Morphometric variation in tundra swans: relationships among sex and age classes. Condor 1988; 90(4): 802-15.
21. Miroğlu A, Demirtaş S. Türkiye'deki *Calopteryx splendens* (Harris, 1782) (Insecta: Odonata) alttürlerinin ekolojik niş modellemesi. Süleyman Demirel Üniv Fen Bil Enst Dergisi 2017. DOI: 10.19113/sdufbed.53284
22. Newton I. The speciation and biogeography of birds. London: Academic Press, 2003; p. 668.
23. Roselaar CS. Songbirds of Turkey. An atlas of biodiversity of Turkish passerine birds. Sussex: NL and Pica Press, 1995; p. 240.
24. Selander RK. Sexual dimorphism and differential niche utilization in birds. Condor 1966; 68(2): 113-51.
25. Selander RK. Sexual selection and dimorphism in birds. In B Campbell eds: Sexual selection and the Descent of Man. Chicago: Aldine Publ Co, 1972; 180-230.
26. Shine R. Ecological causes for the evolution of sexual dimorphism: A review of the evidence. Q Rev Biol 1989; 64(4):419-61.
27. Snow DW, Perrins CM. The Birds of the Western Palearctic Concise Edition. Oxford: Oxford University Press, 1997; p. 1215-18.
28. Spencer R. The ringer's manual. Third Edition. Hertfordshire: British Trust for Ornithology, 1984; p. 138.
29. Svensson L. Identification guide to European passerines. Stockholm and Thetford: British Trust for Ornithology, 1992; p. 368.
30. Yenyurt C, Çağırkaya S, Lise Y, Ceran Y. (editörler). Kızılırmak Deltası Sulak Alan Yönetim Planı 2008-2012. Ankara: Çevre ve Orman Bakanlığı, 2008; s. 182.
31. Wysocki D. Biometrical analysis of an urban population of the Blackbird (*Turdus merula*) in Szczecin (NW Poland). Ring 2002; 24(2): 69-76.
32. Zink RM. The role of subspecies in obscuring avian biological diversity and misleading conservation policy. Proc Royal Soc B Biol Sci 2002; 271(1539): 561-64.

Sorumlu Yazar:

Dr. Arzu GÜRSOY ERGEN
 Ondokuz Mayıs Üniversitesi
 Fen Edebiyat Fakültesi
 Biyoloji Bölümü Samsun - TÜRKİYE
 Tel: 0 - 362 - 312 19 19
 E - posta: agursoy@omu.edu.tr



Kitosan-Gümüş Nanopartikülü ve Kitosan-Gümüş-Grafen Oksit Nanokompozitinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi*

Dilşad ONBAŞLI¹, Gökçen YUVALI ÇELİK¹, Gökşen Dilşat DURBİLMEZ¹, İsmail ÖÇSOY²

¹Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

Özet: Mikrobiyal patojenlerde antibiyotik dirençliliği dünyada ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Son yıllarda, antimikrobiyal aktiviteye sahip yeni bileşikler geliştirmek için daha etkili alternatif tedavi yaklaşımları araştırılmaktadır. Nanopartiküller (NP) sahip oldukları üstün özellikler nedeniyle, antibakteriyel etki, kanser terapisi, ilaç ve gen taşıyıcı sistemler gibi birçok alanda uygulama bulmaktadır. Bu çalışmada, hidrotermal yöntemle sentezlenen yeni nesil bir antimikrobiyal ajan olarak kitosan-gümüş nanopartikülü (K-Ag-NP) ve kitosan-gümüş-Grafen Oksit (K-Ag-GO) nanokompoziti (NK) kullanılmıştır. Bu maddeler UV-visible (UV-vis) absorpsiyon spektroskopisi ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edilmiştir. Aynı zamanda bu maddelerin *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 68175, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 90028 suşlarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon tekniği kullanılarak araştırılmıştır. Elde ettiğimiz veriler bu maddelerin antibakteriyel etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyal aktivite, grafen oksit nanokompoziti, gümüş nanopartikülü, kitosan

Synthesis and Characterization of Chitosan-Silver Nanoparticle and Chitosan-Silver-Graphene Oxide Nanocomposite with Their Determination of Antimicrobial Activities

Summary: Antibiotic resistance in microbial pathogens has become a serious health problem in the world. In recent years, more effective alternative treatment approaches have been investigated to develop new compounds with antimicrobial activity. Nanoparticles (NPs) find applications in many areas such as antibacterial effects, cancer therapy, drugs and gene delivery systems due their superior properties. In this study, chitosan-silver nanoparticles (K-Ag-NP) and chitosan-silver-graphene oxide (K-Ag-GO) nanocomposites (NK) synthesized by hydrothermal method were used as a new generation antimicrobial agent. These materials were characterized by UV-visible absorption spectroscopy and scanning electron microscopy (SEM). Antimicrobial activities of those against *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 68175, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Candida albicans* ATCC 90028 strains were also tested by using disk diffusion method. The data we have obtained show that these materials have antibacterial effect.

Key words: Antimicrobial activity, chitosan, graphene oxide nanocomposite, silver nanoparticle

Giriş

Nanoteknoloji biyoloji, kimya ve fizik gibi temel bilimlerin mühendislik ile bütünleştirildiği, nanoteknoloji ile üretilen nanoyapıların geleneksel yöntemlerle üretilenlere göre daha üstün kabul edilen özellikler sergilediği, son yılların en gözde bilim alanlarından biri olarak kabul edilmektedir. Nanopartiküller (NP); boyutları 1-100 nm arasında değişen, doğal (proteinler, polisakkaritler) ya da sentetik (üretim sırasında sentezlenenler, önceden sentezlenenler) yapıdaki polimerlerle de hazırlanabilen, hazırlama yöntemine göre nanoküre veya nanokapsül olarak adlandırılan ve etkin maddenin partikül içinde çözündü-

rüldüğü, hapsedildiği ve/veya yüzeye adsorbe edildiği yada bağlandığı matris sistemlerdir (11,15,42). Son yıllarda, nanoteknoloji tıp ve biyoteknoloji alanında NP sistemlerle ilgili araştırmalara ve uygulamalara ilişkin çalışmaların sayısında önemli derecede artış olmuştur (6,11,42). Tıptaki uygulamalar özellikle; ilaç, gen ve antijenler için taşıyıcı olarak kullanılması, *in vitro/in vivo* diagnostiklerin uygulanması, diyet destekleyiciler, geliştirilmiş biyouyumlu materyallerin üretimi gibi konuları kapsamaktadır (1,8,11,19-22,24,36). Doğal ya da sentetik polimerlerin kullanılması ile elde edilen ilaçların yanı sıra, proteinler, peptitler ve genlerin de ilgili dokuya hedeflendirilmeleri, ilaçların, proteinlerin ya da peptidlerin stabilitesinin artırılmaları için kullanılan nanopartiküllerin sağladığı en önemli avantajlardan birisi, NP'lerin küçük partikül bo-

Geliş Tarihi/Submission Date : 20.07.2017

Kabul Tarihi/Accepted Date : 26.12.2017

*Bu çalışma 3. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresinde tebliğ edilmiş ve özeti yayımlanmıştır.

yutlarına sahip olmasıdır. Böylece küçük kapilerlerden geçerek hücrelere alınır ve hedef bölgede etkili etkin madde akümülyasyonunu sağlarlar (14-17,35,47). Diğerleri ise, NP'lerin hazırlanmasında biyobozunur materyallerin kullanılmasıdır. Biyobozunur malzemeler günler hatta haftalar süren periyotlarda hedef dokuda kontrollü etkin madde salımını sağlamaktadırlar (44). Kitosan; (i) biyobozunur, biyo-uyumlu, güvenli ve toksik olmayan, doğal bir polimerdir (ii) memeli ve mikroorganizma hücrelerine bağlanabilme, (iii) bağ dokusu üzerinde rejeneratif aktivite, (iii) kemik üreten hücre (osteoblast) oluşumunu hızlandırıcı aktivite, (iv) kanamayı durdurucu (hemostatik) aktivite, (v) antimikrobiyal aktivite, (vi) anti-kanserojen aktivite, (vii) anti-kolesterol aktivite, (viii) kemik oluşumunu hızlandırıcı aktivite, (ix) merkezi sinir sistemini baskılayıcı aktivite ve (x) bağışıklık sistemini uyarıcı aktivite şeklinde sıralanabilecek birçok biyolojik özelliğe sahiptir (18). Kitosan ve türevlerinin biyolojik önemli özelliklerinden birisi sahip oldukları antimikrobiyal aktivitedir. Kitosanın antibakteriyel, antifungal ve antiviral aktiviteye sahip olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Ayrıca algelere karşı da aktiftir (23,31,38).

Mikrobiyal direncin artması, halk sağlığının yönetimini, modern dünyada önemli bir konuya getirmiştir. Son yıllarda birçok yeni antibiyotik geliştirilmiş olsa da, hiç biri çoklu ilaç dirençli (MDR) enfeksiyonlarla mücadele etmek için yeterli değildir (29). Bu nedenle, dirençli patojenler için alternatif ve daha etkili terapötik stratejiler geliştirilmesi önemlidir. Son yıllarda materyal bilimi ve biyolojiji birleştiren bir alan olan nanobiyoteknoloji bilimindeki ilerlemeler, antimikrobiyal özellikteki NP'lerle çalışıldığını göstermiştir. NP'ler ve kitosan, birçok avantajlarından dolayı tıp, biyomedikal, biyomühendislik, farmasötik ve kozmetik alanlarında oldukça fazla ilgi görmektedir. Kronik hastalıkların teşhisinde terapötik maddelerin verilmesinde başarılı bir şekilde kullanılan NP'ler (50) cilt ve yanık yaralarında bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için de bir seçenek olmuştur. NP'i ve kitosani yeni nesil antimikrobiyal ajanlar olarak geliştirmek, Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde görülen ilaç direnci sorununu gidermek için cazip ve uygun maliyetli bir araç olabilir. Bu çalışmanın amacı kitosani kullanarak gümüş nanopartikülü (Ag-NP) ve gümüş-grafen oksit-nanokompozit (Ag-GO NK)'lerinin sentezi ve karakterizasyonu için basit ve çevre dostu bir yaklaşım geliştirerek, kitosan-

gümüş-nanopartikülü (K-Ag-NP)'ü ve kitosan-gümüş-grafen oksit-nanokompozit (K-Ag-GO NK)'lerinin *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 68175, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 90028 suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitelerini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Bu çalışmada, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Streptococcus mutans* ATCC 68175, *Candida albicans* ATCC 90028 suşları kullanılmıştır. Bu suşlar Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

Kitosan-Gümüş Nanopartikülü (K-Ag-NP)'nin Sentezi

Çalışmada, 4 mL 50 mM AgNO₃ (gümüş nitrat (AgNO₃) %99'luk Sigma Aldrich) ve 30 mg/mL 10 mL kitosan (K) %1 lik asetik asit hazırlanmıştır. Bu iki çözelti 30 dakika boyunca karıştırılarak teflona aktarılmıştır. Etüvde 95°C'de 24 saat boyunca bekletilmiş ve elde edilen malzeme daha sonra karakterize edilmiştir.

Kitosan-Gümüş-Grafen oksit Nanokompoziti (K-AgGO-NK)'nin Sentezi

Gümüş-grafen oksit nanokompoziti (Ag-GO NK) Sriram ve ark. (45) tarafından önerilen yönteme göre sentezlenmiştir. Grafen oksit (GO) tarafından gümüş nanopartikülleri (Ag-NP)'nin yakalanması için farklı konsantrasyonlarda iki aşamalı olarak NaCl çözeltisi eklenerek sentez işlemi gerçekleştirilmiştir. GO (final konsantrasyonu 0.1 mg/mL) karıştırken üzerine önceden sentezlenmiş olan Ag-NP çözeltisi 2 mL eklenmiş ve karışma işlemi devam ederken NaCl çözeltisi (2.4 mL, 0.09 M) damla damla ilave edilmiştir. Ag-NP'nin ön toplanması gerçekleştikten belirli bir süre sonra (10s) NaCl çözeltisi (5 mL, 0.29 M) damla damla ilave edilmiştir. Karışım 30 dk karışmaya bırakılarak daha sonra karışım 3000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Oluşan Ag-NP/GO içeren solüsyon 5000 rpm'de 10 dk santifüj edilerek ayrılmış ve katı Ag-GO parçacıkları 5 mL deiyonize su içerisinde dağıtılarak, santrifüj işlemi tekrarlanmıştır.

Antimikrobiyal Aktivitenin İncelenmesi

Kitosan-gümüş nanopartikülü (K-Ag-NP) ve kitosan-gümüş-grafen oksit nanokompozitinin (K-Ag-GO NK) test suşları üzerinde antimikrobiyal aktivitesi Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü

sü'ne göre disk difüzyon metodu kullanılarak yapılmıştır (10). Steril kabin içerisinde 0.5 McFarland bulanıklığında ayarlanmış olan mikroorganizma süspansiyonundan steril şartlarda 100 µL alınarak ve daha önce hazırlanan katı besiyeri ortamına ekilmiştir. Boş steril antibiyotik disklerine 15 µL 30 ppm olacak şekilde K-Ag-NP ve K-Ag-GO NK'i emdirilmiştir. Bu diskler katı besi yerinin üzerine düzgün bir şekilde yerleştirilmiştir. Kontrol grupları da aynı paralelde hazırlanmıştır. Bu işlemlerden sonra mikroorganizmalar 37°C'de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonucunda oluşan inhibisyon zonları kumpas yardımı ile ölçülerek zon çapları milimetre (mm) olarak kaydedilmiştir. Tüm analizler iki paralelli olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Bulgular

K-Ag-NP'nün ve K-Ag-GO NK'nin Sentez ve Karakterizasyonu

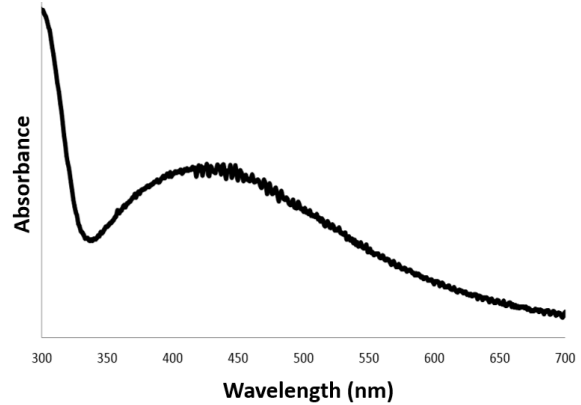
Hidrotermal yöntem ile kitosan, indirgenme ve stabilize ajanı olarak kullanılıp gümüş (Ag^+) iyonlarını, gümüş metal formuna indirgeyerek kararlı K-Ag-NP'ü sentezlenmiştir. Kitosan molekülleri ile Ag^+ iyonlarının etkileşiminde elektron transferi kitosandan Ag^+ iyonlarına doğru akar ve kitosan oksitlenirken Ag^+ iyonları Ag metal formuna indirgenerek Ag çekirdekleri oluşur. Klasik NP sentezinde olduğu gibi çekirdeklenmeyi, büyüme basamağı takip ederek kitosan moleküllerinin üzerine bağlandığı kararlı Ag-NP sentezlenir. Uv-Vis spektrumdaki Ag-NP'ye ait dar absorptans piki ve Ag-NP çözeltisinde 2 hafta boyunca çökelti oluşmaması, kararlı Ag-NP'lerin varlığını gösterir. Plazmonik NP'lerden olan dairesel Ag-NP'lerin karakteristik UV-Vis absorptans piki 400-440 nm aralığındadır. Yapı-



Şekil 1. K-Ag-NP



Şekil 2. K-Ag-GO NK

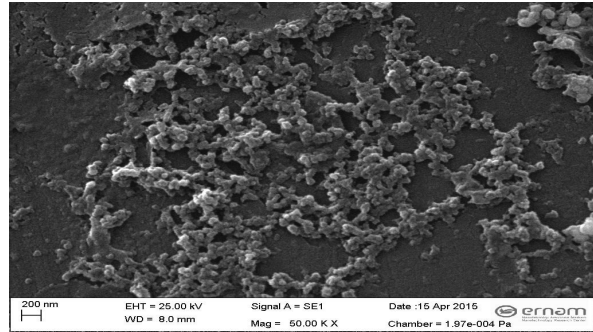


Şekil 3. Ag-NP UV-vis spektroskopisi (Ag-NP Karakteristik absorptans piki: ~440 nm)

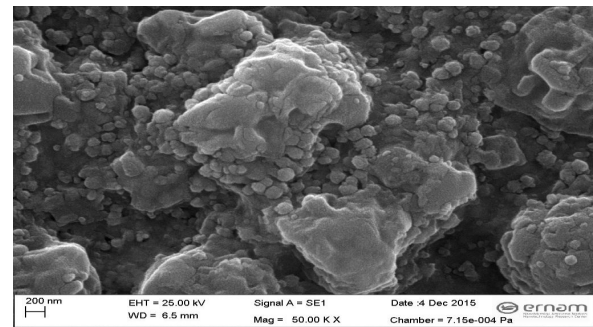
lan analiz sonucunda, K-Ag-NP çözeltisinin absorptans noktası da yaklaşık olarak 440 nm olarak ölçülmüştür. Bu durum K-Ag-NP oluşumunun en önemli göstergelerinden biridir. K-Ag-NP'nün 5 mg/mL ile 50 µg/ml GO çözeltisini karıştırarak kitosan-gümüş-grafen oksit (K-Ag-GO) nanokompoziti sentezlenmiştir. Oluşan K-Ag-NP turuncu-kahverengi, K-Ag-GO NK'i ise gri-siyah renktedir (Şekil 1 ve Şekil 2). Aynı zamanda UV-Vis spektrofotometresi ile Ag-NP'nin UV-Vis spektrumu alınmıştır (Şekil 3).

SEM Analizi

ZEISS EVO LS10 SEM 25 kV çalışma geriliminde kullanılarak görüntüler elde edilmiştir (Şekil



Şekil 4. Ag-NP SEM görüntüsü Ag-NP: ~ 45 nm



Şekil 5. Ag-GO NK'nin SEM görüntüsü

4, Şekil 5). Konsantre 50 µL Ag-NP sulu çözeltisi karbon bant kaplı stub üzerine damlatılmıştır ve berrak görüntülerin elde edilmesi için bir gece boyunca kurutulmuştur.

K-Ag-NP'ü ve K-Ag-GO-NK'nin Antimikrobiyal Aktivitesi

Disk difüzyon metoduna göre tespit edilen antimikrobiyal aktivite sonuçları Tablo 1.'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre; K-Ag-NP'nün *E. coli* ATCC35218 (4.7±0.1), *S. aureus* ATCC 25923 (3.4±0.2), *S. mutans* ATCC 68175 (3.0±0.2), *B. subtilis* ATCC 6633 (2.2±0.0) suşlarına karşı ve K-Ag-GO-NK'nin *E. coli* ATCC35218 (2.5±0.1), *S. aureus* ATCC 25923 (2.5±0.1), *S. mutans* ATCC 68175 (1.4±0.0), *B. subtilis* ATCC 6633 (1.5±0.1) suşlarına karşı antibakteriyel etki gösterdiği fakat *C. albicans* ATCC 90028 suşuna karşı antifungal aktiviteye sahip olmadığı tespit edilmiştir. Çalışmada aynı zamanda K-Ag-NP'nin test suşlarına karşı K-Ag-GO-NK'den daha yüksek antibakteriyel etki gösterdiği de belirlenmiştir. K-Ag-NP test bakterileri arasında en yüksek aktiviteyi ise gram negatif bir bakteri olan *E. coli* ATCC 35218 suşuna karşı göstermiştir.

Özellikle ilaç taşınması, antimikrobiyal uygulamalar ve kanser terapisi konularında, nanopartiküller ile yapılan çalışmalar oldukça ümit vericidir (46). Metaller nanopartiküller uzun yıllardır antimikrobiyal ajan olarak kullanılmaktadırlar. Bakterilerin metal nanopartiküllerine karşı direnç kazanma ihtimali, diğer konvansiyonel ve dar spektrumlu antibiyotiklerden daha azdır (34). Gümüşün antimikrobiyal aktivitesi yüzyıllardır bilinmektedir. Biyolojik uygulamalarda geniş bir kullanıma sahiptir. Antifungal, antibiyotiklere karşı dirençli bakteriler için, enfeksiyonların önlenmesi, yara iyileştirme ve anti-inflamatuvar gibi kullanım alanları yer almaktadır (5,25,39,40). Antimikrobiyal etki mekanizmalarının, tam olarak anlaşılmasına rağmen, reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve bakterinin hücre zarına bağlanmasını içeren bir mekanizmayla, hücre zarına zarar verdiği belirlenmiştir (43,51). Grafen çok yönlü bir karbon bileşiği olarak birçok uygulama alanına konu olmuş ve kullanım alanları genişlemekte olan bir nanomateryaldir (2). Grafen elmastan sert ancak esnek yapıdadır, hafif ve kuvvetlidir. Ayrıca transparan, inert, yoğun, yüksek iletkenlik ve termal iletkenlik gibi özelliklerinden dolayı önemli bir molekül olarak

Tablo 1. K-Ag-NP'ü ve K-Ag-GO-NK'nin disk difüzyon testi sonuçları

Test suşları	İnhibisyon Zon Çapı (mm)	
	K-Ag-NP	K-Ag-GO-NK
<i>E. coli</i>	4.7±0.1	2.5±0.1
<i>S. aureus</i>	3.4±0.2	2.5±0.1
<i>S. mutans</i>	3.0±0.2	1.4±0.0
<i>B. subtilis</i>	2.2±0.0	1.5±0.1
<i>C. albicans</i>	-	-

"-" Herhangi bir etki gözlenmemiştir

"±"Ortalama ±Standart sapma

"NP, NK"Nanopartikül, Nanokompozit (30 ppm); "K" KITOSAN; "Ag" Gümüş; "GO" Grafenoksit

Tartışma ve Sonuç

Günümüzde fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olan nano boyuttaki ilaç partiküllerinin sentezlenmesi, yeni farmasötik ürünlerin geliştirilmesinde ilgi çekici bir konu haline gelmiştir. Nanopartiküllerin sahip olduğu eşsiz elektriksel, kimyasal, mekanik ve optik özellikleri, yüksek yüzey alanı/hacim oranları ve oldukça küçük boyutları sayesinde etkin antimikrobiyal özellik gösterdikleri gözlemlenmiştir (30). Tüm bu farklı özellikleri nanopartiküller, hastalıkların tanısı ve tedavisinde ilgi odağı haline getirmiştir (46).

görülmektedir (2). Ayrıca grafen oksitte biyoyumludur (7). Grafen oksit, grafit tabakalarının oksitlenerek birbirinden ayrılmış tek katmanlı halidir (3). Geniş yüzey alanına, mükemmel elektriksel ve termal iletkenlik ve biyoyumluluk gibi eşsiz fizikokimyasal özelliklere sahiptir. Antimikrobiyal ajan olarak yapılan çalışmalarda grafen oksidin toksikliğini azaltmak ve verimliliğini arttırmak için, farklı inorganik nanoyapılar, biyomoleküller ve polimerler ile yüzey modifikasyonu ve fonksiyonizasyonu geliştirilmiştir (26,28).

Doğal bir biyopolimer olan kitosan ise, özellikle son 50 yıldır araştırmacılar için ilginç bir materyal olarak yerini korumaktadır. Kitine göre birçok avantaja da sahip olan kitosan basta gıda, kozmetik, ziraat, tıp, eczacılık, kağıt ve tekstil olmak üzere birçok endüstri dalında kullanım alanı bulmuştur (13). Doğada bulunan kaynaklardan bol miktarda elde edilebilen kitosan, canlılara karşı toksik özelliğinin olmaması, biyolojik olarak parçalanabilirliği, biyouyumluluğu, kimyasal ve fiziksel özellikleri bakımından diğer biyopolimerlere göre üstün özellikler göstermesi nedeniyle birçok alanda karşımıza çıkmaktadır (13). Kitosan nanoparçacıkları (K-NP) antibakteriyel, antimikrobiyal ve antifungal etkilere sahiptir (46). Bazı araştırmacılar kitosanın selüloz gibi diğer polimerlerle karışımını sağlamışlar ve kitosanın polikationik doğasının hücre membranı yüzeyindeki makromoleküllerin negatif yüklü rezidüleri ile etkilenmesinin bakteri ve fungusların ölümüne neden olduğunu belirtmişlerdir (48). KNP'nin midede ilaç tahrişini önleyen ya da azaltan asit giderici ve antiülser etkilerinin yanısıra kontrollü ilaç salımı (kitosan jelleri, tabletleri, mikroküreleri ve mikrokapsülleri ile gerçekleştirilen) sistemlerindeki yararlarından dolayı kullanımı oldukça önem taşımaktadır (33,41).

Jena ve ark. (21) kitosan kaplı gümüş nanopartiküllerinin (K-AgNP) insan patojenlerine ve makrofaj hücrelerine karşı toksisitesi ve antibakteriyel etkisini değerlendirmişlerdir. Bu çalışma ile K-Ag-NP farklı insan patojenlerine karşı güçlü antibakteriyel aktivite gösterdiği ve ayrıca bakteriyel biyofilm oluşumunu önlediği sonucuna varmışlardır. Spesifik dozdaki kitosan temelli gümüş nanopartiküllerinin vücut hücrelerine zarar vermeden bakteriyi öldürdüğü ve böylece bakteriyel kolonizasyonu ve ilaç direnciyle mücadele etmek için dizayn edilecek olan antibakteriyel ajana potansiyel örnektir. Başka bir çalışmada kitosan jel ile formüle edilmiş gümüş nanopartiküllerinin antibiyofilm etkisinin ve insan fibroblastları üzerine olan sitotoksik etkisi incelenmiştir. Gümüş nanopartiküllerinin geniş spektrumlu antibakteriyel ajan olarak kullanılabilirliği son çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak medikal alanda, sitotoksik etkileri onların kullanımını sınırlandırmaktadır. Çalışmada, gümüş nanopartikülleri ile yüklü kitosan nanopartiküllerinin antibiyofilm kapasitesi değerlendirilmiştir. Bu işlem gümüş sulfadiazin (SSD) kullanılarak yapılmıştır. Sonuç olarak, kronik yaralardaki infeksiyonlarının önlenmesinde ve tedavisinde,

kitosan jelleri ile Ag-NP'nin kullanılabilirliği gösterilmiştir (37). Liu ve ark. (27) ile Das ve ark. (12) tarafından yapılan çalışmalarda, GO-Ag hibrid kompozitleri özgün antibakteriyel sistemler olarak kullanmışlardır. Grafen oksit (GO) nanoset yüzeyinin Ag nanopartiküller tarafından modifiye edilmesi, antimikrobiyal özelliğini; GO-NP'nin kararlılığını ve dispersitesini arttıracıcağını bildirmişlerdir. Grafen oksit-gümüş (GO-Ag) nanokompozitlerin konjuge formları, sinerjik etki ve bakteri hücreleri arasındaki etkileşimi azaltarak negatif yüzeyle ilgili antibakteriyel aktivitenin artmasına neden olduklarını vurgulamışlardır. Zhu ve ark. (52) Ag-NP'nin GO tabakalarına konjuge edilmesi için farklı yoğunluk, boyut ve formlara sahip bir bağlayıcı olarak poli dialildimetilamonyum klorür (PDDA) kullanmışlar ve GO-PDDA-AgNP'nin antibakteriyel aktivitesinin Ag-NP'ine kıyasla önemli ölçüde arttırdığını ortaya koymuşlardır. Cai ve ark. (4) yaptıkları bir çalışmada polietilenimini (PEI), indirgenmiş grafen oksit (rGO)'in Ag-NP'ne konjugasyonu için bağlayıcı olarak kullanmışlardır. Bu hibridin, yüksek çözünürlük, kararlılık, hafif sitotoksikite, uzun süreli antibakteriyel etki gösterdiğini ve GO'nun 46.7 mV'luk negatif zeta potansiyeli ile stabil kalmasını sağladığını, GO-PEI-Ag-NP'nin polivinilpirolidon (PVP)-Ag-NP'e göre uzun süre antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğunu ve mükemmel stabilite gösterdiklerini tespit etmişlerdir. Veerapandian ve ark. (49) *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium*, *B. subtilis*, *E. coli*, için UV ışınlarına maruz bırakılmış GO nanosetlerinin minimum bakterisid konsantrasyonunun (MIC) normal nanoset ve antibiyotik olan kanamisininkinden daha düşük olduğunu belirlemişlerdir. GO'ün yüksek güçte antibakteriyel özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Chen ve ark. (9) GO'ün bakteriyel ve fungal patojenlerin çoğalması üzerinde güçlü bir etkisi olduğunu göstermişlerdir (bakterilerin yaklaşık %90'ı öldürülmüş ve %80 makroconidia çimlenmesini bastırmıştır). Ochoy ve ark. (32) *Xanthomonas perforans*'la yaptıkları bir çalışmada GO üzerinde büyüyen DNA yönlendirmeli Ag-NP'ini geliştirmişlerdir. Gümüş-çiftzincirli DNA-grafen oksit (Ag-dsDNA-GO) kompozitlerinin kültürde ve bitkilerde *X. Perforans*'ın hücre canlılığını etkili bir şekilde azatlığını ve çok düşük konsantrasyonda bu kompozitin, gelişmiş stabilite, arttırılmış antibakteriyel aktivite ve daha güçlü adsorpsiyon özellikleri açısından önemli avantajlar sağlayan mükemmel antibak-

teriyel özellik gösterdiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışma sonuçları denemelerimizi destekler niteliktedir. Yaptığımız çalışmada, kitosan kullanılarak Ag-NP ve Ag-GO-NK'nin sentezi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda bu maddelerin, *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 25923, *S. mutans* ATCC 68175, *B. subtilis* ATCC 6633, *C. albicans* ATCC 90028 suşlarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Elde ettiğimiz veriler K-Ag-NP ve K-Ag-GO-NK'nin antibakteriyel etkiye sahip olduklarını fakat antifungal bir aktivite göstermediklerini ortaya çıkarmıştır. Diğer yandan K-Ag-GO NK'nin K-Ag-NP'e göre daha düşük antibakteriyel aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, mikroorganizmaların antibiyotiklere direnç geliştirmeleri ve sürdürülebilir sağlık koşullarının ekonomik olarak sağlanması amacıyla çok sayıda araştırmacı, yeni ve etkili antimikrobiyal ajanlara dayanıklılık geliştirmeye yönelik teknoloji arayışına girmişlerdir. NP'ler ve kitosan sahip oldukları eşsiz ve etkin antimikrobiyal özellikleri sayesinde hastalıkların tanı ve tedavisinde ilgi odağı haline gelmişlerdir. Bu çalışmada, K-Ag-NP'ü ve K-Ag-GO NK, kitosan kullanılarak sentezlenmiş ve elde edilen veriler bu maddelerin antibakteriyel potansiyele sahip olduklarını göstermiştir. Dolayısıyla bu çalışmada kullanılan K-Ag-NP'ü ve K-Ag-GO NK'nin, çeşitli bulaşıcı hastalıklara sebep olan Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin tedavisinde, mevcut antibiyotiklere alternatif olarak yeni antimikrobiyal bir ajan olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Ancak, bu moleküllerin stabilite, immünogenetik, farmakokinetik ve farmakodinamik ve özellikle de klinik etkileri hakkında daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Kaynaklar

1. Akagi T, Baba M, Akashi M. Biodegradable nanoparticles as vaccine adjuvants and delivery systems: Regulation of immune responses by nanoparticle-based vaccine. Kunugi S, Yamaoka T. eds. In: Polymers in Nanomedicine. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2011; p.31-64.
2. Bedeloğlu A, Taş M. Grafen ve grafen üretim yöntemleri. AKU J Sci Eng 2016; 16(3): 544-54.
3. Bianco A, Cheng HM, Enoki T, Gogotsi Y, Hurt RH, Koratkar N, Zhang J. All in the graphene family-A recommended nomenclature for two-dimensional carbon materials. Carbon 2013; 65:1-6.
4. Cai X, Lin M, Tan S, Mai W, Zhang Y, Liang Z, Lin Z, Zhang X. The use of polyethyleneimine-modified reduced graphene oxide as a substrate for silver nanoparticles to produce a material with lower cytotoxicity and long-term antibacterial activity. Carbon 2012; 50 (10): 3407-15.
5. Carmona D, Lalueza P, Balas F, Arruebo M, Santamaría J. Mesoporous silica loaded with peracetic acid and silver nanoparticles as a dual-effect, highly efficient bactericidal agent. Micropor Mesopor Mat 2012; 161:84-90.
6. Chan WC. Bionanotechnology progress and advances. Biol Blood Marrow Transplant 2006; 12(1): 87-91.
7. Chang Y, Yang, ST, Liu JH, Dong, E, Wang Y, Cao A. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. Toxicol Lett 2011; 200(3): 201-10.
8. Chen Y, Mohanraj VJ, Parkin, JE. Chitosan-dextran sulfate nanoparticles for delivery of an anti-angiogenesis peptide. Int J Pept Res Ther 2003; 10(5-6): 621-9.
9. Chen J, Peng H, Wang X, Shao F, Yuan Z, Han H. Graphene oxide exhibits broad spectrum antimicrobial activity against bacterial phytopathogens and fungal conidia by intertwining and membrane perturbation. Nanoscale 2014; 6(3): 1879-89.
10. CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved standard: M02-A10. Tenth Edition Vol. 29, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA: 2009; p.1.
11. Çırpanlı Y. Kamptotesin içeren polimerik ve oligosakkarit bazlı nanopartiküller formülasyonların geliştirilmesi ve in vitro-in vivo değerlendirilmesi, Doktora tezi, Hacettepe Üniv Sağlık Bil Ens, Ankara 2009; s. 4-15.
12. Das MR, Sarma RK, Saikia R, Kale VS, Shelke MV, Sengupta P. Synthesis of silver nanoparticles in an aqueous suspension of graphene oxide sheets and its antimicrobial activity. Colloids Surf B Biointerfaces 2011; 83(1): 16-22.
13. Demir A, Seventekin N. Kitin, kitosan ve genel kullanım alanları. Tekstil Tekno Elek Derg 2009; 3: 92-103.
14. Derman Acar S. Canine parvovirus'e ait antijenik özellikli sentetik peptidlerin sentezi ve biyokonjugatlarının geliştirilmesi, Doktora tezi, Yıldız Teknik Üniv Fen Bil Ens, İstanbul

- 2012; s. 45-53.
15. Derman S, Kızılbey K, Akdeste ZM. Polymeric nanoparticles. *J Eng Nat Sci* 2013; 31: 107-20.
 16. Desai MP, Labhasetwar V, Amidon GL, Levy RJ. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: Effect of particle size. *Pharm Res* 1996; 13(12): 1838-45.
 17. Desai MP, Labhasetwar V, Walter E, Levy RJ, Amidon GL. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm Res* 1997; 14(11): 1568-73.
 18. Dutta PK, Dutta J, Tripathi VS. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *J Sci Ind Res* 2004; 63(1): 20-31.
 19. Freitas RA. What is nanomedicine? *Nanomedicine* 2005; 51: 325-41.
 20. Govender T, Riley T, Ehtezazi T, Garnett MC, Stolnik S, Illum L, Davis SS. Defining the drug incorporation properties of PLA-PEG nanoparticles. *Int J Pharm* 2000; 199 (1): 95-110.
 21. Jena P, Mohanty S, Mallick R, Jacob B, Sonawane A. Toxicity and antibacterial assessment of chitosan-coated silver nanoparticles on human pathogens and macrophage cells. *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 1805-18.
 22. Kreuter J. Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain. *J Nanosci Nanotech* 2004; 4(5): 484-8.
 23. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Int J Food Microbiol* 2010; 144(1): 51-63.
 24. Kunzmann A, Andersson B, Thurnherr T, Krug H, Scheynius A, Fadeel B. Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1810(3): 361-73.
 25. Landry BK, Nadworny PL, Omotoso OE, Maham Y, Burrell JC, Burrell RE. The Kinetics of thermal instability in nanocrystalline silver and the effect of heat treatment on the antibacterial activity of nanocrystalline silver dressings. *Biomaterials* 2009; 30(36): 6929-39.
 26. Lightcap IV, Kosel TH, Kamat PV. Anchoring semiconductor and metal nanoparticles on a two-dimensional catalyst mat. Storing and shuttling electrons with reduced graphene oxide. *Nano Lett* 2010; 10(2): 577-83.
 27. Liu L, Liu J, Wang Y, Yan X, Sun DD. Facile synthesis of monodispersed silver nanoparticles on graphene oxide sheets with enhanced antibacterial activity. *New J Chem* 2011; 35(7): 1418-23.
 28. Ma J, Zhang J, Xiong Z, Yong Y, Zhao X. Preparation, characterization and antibacterial properties of silver-modified graphene oxide. *J Mater Chem* 2011; 21(10): 3350-2.
 29. Mohanty S, Mishra S, Jena P, Jacob B, Sarkar B, Sonawane A. An investigation on the antibacterial, cytotoxic, and antibiofilm efficacy of starch-stabilized silver nanoparticles. *Nanomed: Nanotechnol Biol Med* 2012; 8(6): 916-24.
 30. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, Yacaman MJ. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnol* 2005; 16(10): 2346-253.
 31. No HK, Meyers SP, Prinyawiwatkul W, Xu Z. Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of food: A review. *J Food Sci* 2007; 72(5): 87-100.
 32. Ocsoy I, Paret ML, Arslan Ocsoy M, Kunwar S, Chen T, You M, Tan W. Nanotechnology in plant disease management: DNA-directed silver nanoparticles on graphene oxide as an antibacterial against *Xanthomonas perforans*. *ACS Nano* 2013; 7(10): 8972-80.
 33. Qi L, Xu Z, Jiang X, Hu C, Zou X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydr Res* 2004; 339 (16): 2693-700.
 34. Pal S, Tak YK, Song JM. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73(6): 1712-20.
 35. Panyam J, Sahoo SK, Prabha S, Bargar T, Labhasetwar V. Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly (d, l-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Int J Pharm* 2003; 262(1-2): 1-11.
 36. Panyam J, Williams D, Dash A, Leslie-Pelecky D, Labhasetwar V. Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles. *J Pharm Sci* 2004; 93(7): 1804-14.
 37. Perez-Diaz M, Alvarado-Gomez E, Sanchez-Sanchez R, Velasquillo C, Gonzalez C,

- Ganem-Rondero A, Martinez-Castanon G, Zavala-Alonso N, Martinez-Gutierrez F. Antibiofilm activity of chitosan gels formulated with silver nanoparticles and their cytotoxic effect on human fibroblasts. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2016; 60(1): 317-23.
38. Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules* 2003; 4(6): 1457-65.
39. Raffi M, Hussain F, Bhatti T, Akhter JI, Hameed A, Hasan MM. Antibacterial characterization of silver nanoparticles against *E.coli* ATCC-15224. *J Mater Sci Technol* 2008; 24(2): 192-6.
40. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv* 2009; 27(1): 76-83.
41. Rajalakshmi R, Indira Muzib Y, Aruna U, Vinesha V, Rupangada V, Krishna moorthy SB. Chitosan nanoparticles - an emerging trend in nanotechnology. *Int J Drug Deliv* 2014; 6(3): 204-29.
42. Rao JP, Geckeler KE. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size control parameters. *Progress Polymer Sci* 2011; 36(7): 887-913.
43. Slawson RM, Van Dyke MI, Lee H, Trevors JT. Germanium and silver resistance, accumulation, and toxicity in microorganisms. *Plasmid* 1992; 27(1): 72-9.
44. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski, WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release* 2001; 70(1-2): 1-20.
45. Sriram MI, Kanth SB, Kalishwaralal K, Gurnathan S. Antitumor activity of silver nanoparticles in Dalton's lymphoma ascites tumor model. *Int J Nanomedicine* 2010; 5: 753-62.
46. Suri SS, Fenniri H, Singh B. Nanotechnology-based drug delivery systems. *J Occup Med Toxicol* 2007; 2(16): 1-6.
47. Thomas M, Klivanov AM. Conjugation to gold nanoparticles enhances polyethylenimine's transfer of plasmid DNA into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci* 2003, 100(16): 9138-43.
48. Torres-Giner S, Ocio M, Lagaron JM. Development of active antimicrobial fiber based chitosan polysaccharide nanostructures using electrospinning. *Eng Life Sci* 2008; 8(3): 303-14.
49. Veerapandian M, Zhang L, Krishnamoorthy K, Yun K. Surface activation of graphene oxide nanosheets by ultraviolet irradiation for highly efficient antibacterials. *Nanotechnol* 2013; 24(39): 395-706.
50. Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. Nanoparticles in medicine: Therapeutic applications and developments. *Clin Pharmacol Ther* 2008; 83(5): 761-9.
51. Zhao G, Stevens Jr SE. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. *Biometals* 1998; 11(1): 27-32.
52. Zhu Z, Su M, Ma L, Ma L, Liu D, Wang Z. Preparation of graphene oxide-silver nanoparticle nanohybrids with highly antibacterial capability. *Talanta* 2013; 117: 449-55.

Sorumlu Yazar:

Doç. Dr. Dilşad ONBAŞLI
Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı,
Kayseri-TÜRKİYE
Tel: 03522076666/28402
Fax: 03524379169
E-posta: odilsad@gmail.com



Use of Fascia Lata Autograft for Augmentation of Bladder in Rabbits*

Muhammed Kaan YÖNEZ, Gültekin ATALAN

Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, University of Erciyes, Kayseri-TURKEY

Summary: In the present study; experimental defects were created in the rabbits at the urinary bladder and the repair of the defects with autogenous Fascia latae (FL) graft was provided. The aim was to evaluate whether the grafted urinary bladder capacity reached to the normal urinary bladder capacity. A total of 32, healthy male adult New Zealand rabbits were used in this study. The rabbits were randomly divided into four equal groups, i.e. group I, II, III and IV (control) according to the duration of euthanasia. Bladder capacities of the rabbits were measured preoperatively. Experimentally 2x2 cm defects were induced in the urinary bladder of the rabbits and repaired with autogenous FL graft in the first three groups. The rabbits in the control group underwent no surgical application. Postoperative bladder capacities of rabbits in the groups were measured at the end of 4th (group I), 8th (group II) and 12th (group III and IV), weeks before being euthanized. The urinary bladder capacities of control group were compared with those of the rabbits in the other groups. As a result, it was concluded that the autogenous Fascia latae graft might be used successfully in the urinary bladder with decreased capacity.

Key words: Augmentation, bladder, fascia latae, graft

Tavşanlarda İdrar Kesesi Ogmentasyonunda Otojen Fasya Lata Greftinin Kullanımı

Özet: Sunulan çalışmada; tavşanların idrar kesesinde deneysel defektler oluşturularak otojen fasya lata grefti ile defektlerin onarımı sağlanmış ve greft uygulanan idrar kesesi kapasitelerinin normal idrar kesesi kapasitesine ulaşip ulaşmadığının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında, toplam 32 adet erişkin, erkek, sağlıklı Yeni Zellanda tavşanı kullanıldı. Çalışma materyalini oluşturan tavşanlar rastgele, eşit sayıda hayvan içeren dört gruba ayrıldı. Tavşanların operasyon öncesi idrar kesesi hacimleri ölçüldü. Grupları oluşturan tavşanların idrar keselerinde deneysel olarak 2x2 cm boyutunda defektler oluşturuldu ve bu defektler yine aynı tavşandan elde edilen 2x2 cm boyutunda otojen fasya lata dokusu ile onarıldı. Grup I'i oluşturan tavşanlar postoperatif 4. hafta sonunda, grup II'yi oluşturan tavşanlar postoperatif 8. hafta sonunda, grup III'ü oluşturan tavşanlar postoperatif 12. hafta sonunda idrar kesesi hacimleri ölçüldü ve ötenazi edildi. Kontrol grubunu oluşturan tavşanların idrar keselerine herhangi bir işlem uygulanmadan ötenazi edildi ve idrar kesesi kapasiteleri grup I, II ve III'de bulunan tavşanlardan elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldı. Sonuç olarak azalan idrar kesesi kapasitesinin eski kapasitesine ulaştırılmasında otojen fasya lata greftinin kullanılabilirliği kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: Fasya lata, greft, idrar kesesi, ogmentasyon

Introduction

Inflammation that causes scar tissue formation and contraction, sclerosis and spastic neuropathy decrease urinary bladder capacity (9). Low capacity of urinary bladder results in increased frequency of urination. Urinary bladder at low pressure loses storage function and patients face a need for urination at short intervals (e.g.15-30 minutes). Anticholinergic drugs and expansion programs are applied in the medical treatment. Augmentation cystoplasty is referred to in cases where medical treatment is ineffective or due to structural disorders of the urinary

bladder (9).

Augmentation cystoplasty is a commonly used for surgical procedure in order to increasing urinary bladder capacity for the reduction of high intra bladder pressure in patients with low urinary bladder capacity and for protection of the upper urinary tract (12). In the augmentation of the urinary bladder, the small and large bowel segments are widely used in different configurations (21).

As an alternative to augmentation cystoplasty, intravesical pressure-reducing autoaugmentation may be performed. Various materials such as autogenous dura, pericardium, collagen and preserved intestinal submucosa and various methods including vesicomyotomy, vesicomyectomy, seromuscular entereostoplasty were applied for autoaugmentation. However, the

Geliş Tarihi/Submission Date : 09.01.2018

Kabul Tarihi/Accepted Date : 20.02.2018

* This study was supported by Erciyes University Scientific Research Projects Unit. Project number TDK-2016-6356. This study is summarized in the doctoral thesis.

ideal graft material to be used in urinary bladder augmentation has not yet been identified (18).

Fascia latae is used as graft materials in many different organs and tissues because of their strong and flexible content, low, immunologic and inflammatory effects, non-toxic effects, low cost, more resistance bacterial contaminations and easy to obtain. With regard to the urinary system, FL grafts have been successfully used in the closure of urethral defects (4,20), in urethral fistulas (5,11), in the treatment of urinary incontinence (10).

In the present study; the experimental defects were created in rabbit urinary bladders and repair of the defects with autogenous FL graft was provided. The aim of this study was to evaluate whether the grafted urinary bladder capacity reached to the normal urinary bladder capacity.

Materials and Methods

Animals

A total of 32 New Zeland male rabbits, aging between 10-12 months and weighing 2.089 ± 0.52 kg were included in this study. Prior to the study the rabbits were subjected to the thorough clinical examinations and found to be healthy.

Groups

Thirty two adult healthy New Zeland rabbits were randomly allocated into four different groups of eight animals called groups I, II, III (experimental) and IV (control). The autogenous FL grafts were applied to the defects on the urinary bladders of the rabbits in the experimental groups. All rabbits in group I, group II and group III were euthanized at the end of the 4th, 8th and 12th week, respectively. No surgical procedure was applied to control group rabbits and were euthanized at the end of 12th week. Urinary bladder augmentation test results of the rabbits in the control group were compared with that of the experimental groups.

Surgical Procedure

The right leg was routinely shaved and aseptic preparation performed from the coxo-femoral joint level to the tarsal joint for operation. Fascia latae graft measuring 2x2 cm was bluntly separated and harvested with surgical scissors (Figure 1).

After obtaining the FL graft, each rabbit was positioned in dorsal recumbency, midline laparotomy was made and the bladder exposed.



Figure 1. Removal of a 2x2 cm FL graft

Preoperative Augmentation Test

In order to determine the preoperative capacity of the urinary bladder, firstly the urinary bladder was evacuated and then the physiological saline solution was injected via urethral catheter at a rate of 5 mm/min. The amount to injection into the urinary bladder was measured when the piston forced during the injection of the physiological saline solution (Figure 2).



Figure 2. Injection of physiological saline solution into urinary bladder

After the measurement of the preoperative urinary bladder capacity, the defect was created in the most nonvascular area in corpus region of urinary bladder. A simple continuous suture pattern with a 4-0 Polydioxanone was applied to the FL to cover the defected area. The urethral catheter was applied to the bladder and 0.9% saline solution was administered to check for any leakage (Figure 3). After making sure that there was no leakage, the abdominal wall was routinely closed, and the operation was completed.



Figure 3. Control of leakage after application of a FL graft

Postoperative Care

Immediately prior to the operation and during the postoperative five days, animals were treated with ceftriaxone at a dose of 100 mg/kg IM for infection prophylaxis. Postoperative three days butorphanol was injected at a dosage 0.3 mg/kg subcutan (Sc) for analgesia.

Postoperative Augmentation Test

Rabbits completed the follow-up period were anesthetized. Median laparotomy was performed, and urinary bladder taken out of the abdomen. Firstly, a urethral catheter was inserted and the urine drained. Then, the physiological saline solution injection into the urinary bladder made end the postoperative urinary bladder capacity was measured (Figure 4).



Figure 4. Measurement of urinary bladder capacity before euthanasia

Euthanasia

At the end of the study, rabbits were euthanased with Na-pentobarbital at an intravenous (IV) dose of 100 mg/kg.

Statistical Analysis

The data was evaluated in IBM SPSS Statistics 22.0 statistical package program. The descriptive statistics were given as the number of units

(n), mean \pm standard error of mean ($\bar{x} \pm SEM$). Cross-group comparisons were made by One-Way ANOVA on normal dividing variables. In each group, the inter-time comparison was done with Paired Sample T-Test in case of normal dispersion of differences. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

No complications were encountered during operation or anesthesia. At the midline laparotomy, it was observed that the FL graft applied to the defect site completely fused with the urinary bladder and was not macroscopically distinguishable from the urinary bladder. The comparison of the preoperative urinary bladder capacity with postoperative urinary bladder volume is given in Table 1. There was no statistically significant difference between the mean pre and postoperative urinary bladder volume for groups ($P > 0.05$).

In addition, the mean urinary bladder volume obtained before euthanasia in group I, II and III were compared with that of control group. The comparison of the mean data of urinary bladder capacities between groups is given in Table 2. In the comparison of the results of augmentation test between groups, the lowest value (95 ± 4.11 ml) was measured in group I and the highest value (119.37 ± 10.32 ml) in group III. The value obtained from the control group was recorded as 111.87 ± 4.99 ml. There was no statistically significant difference between the groups ($P > 0.05$).

Discussion and Conclusion

In this study, we performed augmentation of the urinary bladder using FL autografts and tried to evaluate. FL graft and urinary bladder compatibility, preoperative and postoperative capacity of urinary bladder, early and late postoperative findings were evaluated.

The augmentation cystoplasty is performed to increase the capacity of the urinary bladder and thus to improve the quality of life (13). In our study, urinary bladder was assessed by an augmentation test postoperatively. Fascia tissue

Table 1. Comparison of preoperative bladder capacities with postoperative values for groups

	n	Preoperative urinary bladder capacity (ml) $\bar{x} \pm SEM$	Postoperative urinary bladder capacity (ml) $\bar{x} \pm SEM$	p
Group I	8	101.87 \pm 4.42	95 \pm 4.11	0.270
Group II	8	113.75 \pm 6.52	111.87 \pm 4.99	0.504
Group III	8	106.87 \pm 9.58	119.37 \pm 10.32	0.158

Table 2. Comparison of augmentation test results between groups

	n	Postoperative urinary bladder capacity (ml) $\bar{x} \pm SEM$	p
Group I	8	95 \pm 4.11	0.095
Group II	8	111.87 \pm 4.99	
Group III	8	119.37 \pm 10.32	
Control	8	111.25 \pm 5.23	

composed entirely of collagenous tissue is not as flexible as urinary bladder wall. Norlen et al. (15) reported that the collagen tissue is stiffer than the smooth muscle of the urinary bladder. Therefore, the urinary bladder is not as flexible as healthy one when FL graft is applied.

In this study; we did not observe significant difference between preoperative and postoperative mean urinary bladder capacities. There was a slight decrease for mean postoperative urinary bladder capacities in group I (95 \pm 4.11 ml) compared to preoperative mean urinary bladder capacities (101.87 \pm 4.42 ml). In contrast to group I, the urinary bladder reached its former capacity in group II. In group III, the postoperative mean urinary bladder capacity increased above the preoperative measured capacity. The possible reason for the low postoperative urinary bladder capacity in group I might be due to the high collagen content of the graft as reported (15). However, the adaptation and compliance of the FL to the urinary bladder capacities appear to increase with time when the data of group II and group III having a longer postoperative period were considered.

Celayir et al. (6) removed 65% of the bladder tissue in group I and group II. The bladder augmentation was carried out by a full-thickness

Musculus rectus abdominis flap in group I. Moreover, they closed the bladder remnant routinely without any graft application in group II. The preoperative and postoperative urinary bladder capacity at the end of the 4th week were compared and postoperative urinary bladder capacity found to be decreased significantly in both groups. Human amniotic membran graft was applied to experimentally induced a 4x4 cm urinary bladder defects in dogs and the animal monitored for six weeks (22). At the end of the 6th week the urinary bladder capacity was not be able to reach its former capacity. Contrast to those studies, in our study, there was no statistically significant difference between preoperative and postoperative urinary bladder capacity for all groups.

Graft materials obtained from the gastrointestinal system are accepted as the gold standard today despite complications (3,16,17). It has been reported that grafts of intestinal segments have many complications such as chronic bacteriuria, stone formation, calcium-phosphate metabolism disturbance, growth retardation in bones, gastrointestinal motility disorders, mucus secretion, and fluid-electrolyte balance (1,8,16,17). In our study autogenous FL graft was used in augmentation of urinary bladder.

No postoperative complications were encountered.

Autogenous FL graft not is cost effective, harvested easily and at sufficient amounts with minor operation site disturbance and functional defect at the donor site, and also no sign of immunological reaction and tissue rejection at recipient site. In view of these properties of the FL graft (2,7,14) we think that it is a suitable graft material that can be used to provide the urinary bladder to its normal capacity.

As a result, it has been concluded that FL graft material can be used safely in increasing low urinary bladder capacity.

References

1. Abdelrhman MA, Seddek AM, Bakr HA, Elnesr KA. Full-thickness hysterocystoplasty for management of a large bladder defect. Experimental study in goats. *J Vet Med Sci* 2013; 75(6): 767-71.
2. Alkan F, Izci C, Ortatagli M, Ceylan C, Karaman M. The use of autogenous fascia lata to prevent tendon adhesions in dogs. *Turk J Vet Anim Sci* 2002; 26(4): 957-64.
3. Atala A. Tissue engineering for bladder substitution. *World J Urol* 2000; 18(5): 364-70.
4. Atalan G, Cihan M, Sozmen M, Ozaydin I. Repair of urethral defects using fascia lata autografts in dogs. *Vet Surg* 2005; 34(5): 514-8.
5. Ayyildiz A, Celebi B, Akgul KT, Nuhoglu B, Caydere M, Germiyanoglu C. A comparison of free skin graft, fascia lata, alloderm, bovine pericardium and primary repair in urethrocuteaneous fistulas without diversion: an experimental study. *Pediatr Surg Int* 2006; 22(10): 809-14.
6. Celayir S, Kilic N, Dervisoglu S, Buyukunal C. Rectus abdominis muscle flap (RAMF) technique for the management of large bladder defects: urodynamic findings in a rabbit model. *Brit J Urol* 1996; 78(2): 294-7.
7. Demirkan I, Atalan G, Cihan M, Sozmen M, Kankavi O. Replacement of ruptured Achilles tendon by fascia lata grafting. *Vet Cerrahi Derg* 2004; 10(3-4): 21-6.
8. Duel BP, Gonzalez R, Barthold JS. Alternative techniques for augmentation cystoplasty. *J Urology* 1998; 159(3): 998-1005.
9. Ettinger SL. Bladder reconstruction with amniochorion, Master's thesis, The University of British Columbia, Canada 1988; p.132.
10. Griebing TL, Berman CJ, Kreder KJ. Fascia lata sling cystourethropexy for the management of female urinary incontinence. *Int Urogynecol J* 1998; 9(3): 165-73.
11. Kargi E, Yesilli C, Akduman B, Babuccu O, Hosnuter M, Mungan A. Fascia lata grafts for closure of secondary urethral fistulas. *Urology* 2003; 62(5): 928-31.
12. Lavanya K, Sreenu M, Prasad VD, Suresh K. Acellular matrix of swim bladder for augmentation cystoplasty in rabbits. *Int J Agric Sc Vet Med* 2014; 2(2): 7-17.
13. Lavanya K, Sreenu M, Prasad VD, Suresh K. Haemato-biochemical studies on acellular matrix of swim bladder for cystoplasty in rabbits. *Indo-Am J Agric Vet Sci* 2014; 2(2): 1-8.
14. Lincoln JCR, Riley PA, Revignas A, Geens M, Ross DN, Ross JK. Viability of autologous fascia lata in heart valve replacements. *Thorax* 1971; 26(3): 277-283.
15. Norlen L, Trasti H. Functional behaviour of the continent ileum reservoir for urinary diversion. An experimental and clinical study. *Scand J Urol Nephrol* 1978; 49(1): 33-42.
16. Mahfouz W, Elsalmy S, Corcos J, Fayed AS. Fundamentals of bladder tissue engineering. *Afr J Urol* 2013; 19(2): 51-7.
17. Orabi H, Bouhout S, Morissette A, Rousseau A, Chabaud S, Bolduc S. Tissue engineering of urinary bladder and urethra: Advances from bench to patients. *Sci World J* 2013; 2013(1): 1-13.
18. Petrovic V, Stankovic J, Stefanovic V. Tissue engineering of the urinary bladder: Current concepts and future perspectives. *Sci World J* 2011; 11(1): 1479-88.
19. Rabah DM, Begin LR, Zahran A, Corcos J. Tissue reactions of the rabbit urinary bladder to cadaveric human fascia lata and polypropylene surgical mesh. *Can J Urol* 2004; 11(4): 2344-9.
20. Sade C, Ugurlu K, Ozcelik D, Huthut I, Ustundag N, Saglam I, Bas L. Reconstruction of the urethral defects with autologous fascial tube graft in a rabbit model. *Asian J Androl* 2007; 9(6): 835-42.
21. Seif MM, Aimen MS, Kamel HH. Gastric neobladder: An experimental study in dog. *Beni-Suef Vet Med J* 2007; 17(1): 50-60.
22. Shakeri S, Masoudi P, Yazdani M, Monabati A, Mehrabani D, Tanideh N. Evaluation of human amniotic membrane as a substituent.

te for transitional epithelium of bladder in
dog. J Appl Anim Res 2008; 33(1): 55-9.

Corresponding Author:

Research Assistant,
Dr. Muhammed Kaan YÖNEZ
Department of Surgery,
Faculty of Veterinary Medicine,
University of Erciyes, Kayseri-TURKEY
E-mail: kaanyonez@gmail.com



Kayseri Develi Tarımsal Kalkınma Kooperatifi Süt Sığırı Çiftliğinde Bulunan Sığır Tırnaklarının Muayenesi ve Problemlili Tırnakların Sağaltımı*

Birkan PİRÇİ¹, Gültekin ATALAN²

¹Kayseri Develi Tarımsal Kalkınma Kooperatifi, Develi/Kayseri-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

Özet: Bu çalışmada Kayseri ili Develi ilçesinde bulunan bir işletmedeki 100 baş sağmal süt ineğinde tırnak hastalıkları yönünden tarama yapılmış ve 37 hayvanda tırnak bozukluğu saptanarak bunların tedavilerinin yapılması ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Hayvanların vücut ağırlıkları (400-750 kg) ortalama 600 kg, yaşları ise (2-10 yıl) ortalama 5.5 yıl olarak saptandı. Ortalama süt verimleri ise 25±3 litre olarak tespit edildi. Hayvanların laktasyon sayıları 1 ile 6 arasında değişiyordu. Hayvanların öncelikle klinik muayeneleri yapıldı. Enfeksiyöz hastalıkları yönünden yapılan incelemede hiçbir hayvanda bozukluk görülmedi. Hayvanlar tek tek yürütülerek topallık kontrolleri yapıldıktan sonra travaya alındı. Ayaklar askıya alınarak tırnak muayenesi yapıldı. Belirlenen hastalıklar güncel gelişmeler ışığında tedavi edildi. Çalışmada ayak hastalıklarının insidansı % 37 olarak belirlendi. Elde edilen bulgular tırnak hastalıklarının büyük oranda beslenme ve yetiştiricilikten kaynaklandığını ortaya koydu. Bu nedenle, ahır hijyeninin sağlanması, ayak banyolarının düzenli kullanılması, periyodik tırnak kesimi ve bakımının yanı sıra çalışanların bilinçlendirilmesinin ayak hastalıkları oranının düşürülmesinde önemli rol oynayacağı sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Hastalık, sığır, tedavi, tırnak

Examination of the Cattle Foot in the Kayseri Develi Agricultural Milking Farm and Treatment of Foot Disorders

Summary: The aim of this study was to investigate various possible hoof disorders in the cattle housed in Develi Agricultural Development Cooperative farm and to treat hoof diseases according to modern treatment alternatives. The animal material was consisted of 100 milked cattle and 37 of cattle suffered from various hoof disorders. The mean body weight and milk production of the cattle were 400-750 kg (mean 600 kg) and 25±3 respectively. Their lactation period varied between one and six years. Clinical examinations of each cattle were carried out and no sign of general infection was detected for any of the cattle. Walking on the ground, lameness examinations were performed for each cattle and the cattle suffering from lameness were recorded. The animals were then taken for the labor and their hoofs were examined. Diagnosed hoof disorders were treated according to current treatment alternatives. In conclusion, the incidence of foot disorders was found as 37%. This rate was respectively high for a farm. The study revealed that hoof disorders in this farm occurred mainly due to disorders of nutrition and breeding. Therefore, controlling barn hygiene, regular use of footbath, periodic hoof trimming and conscious breeding may play an important role for prevention of hoof disorders in milking cattle.

Key words: Cattle, hoof, labor, lameness

Giriş

Ayak ve tırnak hastalıkları modern sığır işletmelerinde hayvanların sürüden istem dışı olarak çıkarılmalarına yol açan önemli problemlerin başında gelmektedir (13,21,28). Ayak ve tırnak hastalıklarının neden olduğu başlıca kayıplar; süt veriminde azalma, canlı ağırlık kaybı, infertilite problemleri, metabolizma hastalıkları ve sağaltım masrafları olarak sıralanabilir (1,8,13,15,25). Ahırlarda yaşayan hayvanlarda hareket olanakları kısıtlandığından tırnaklarda istenilen oranlarda aşınma oluşmaz, bu nedenle tırnakların

belirli aralıklarla bakımı zorunlu bir hal alır (3,9,23). Özellikle kış mevsimi boyunca ahırlarda yaşayan hayvanlarda hareket noksanlığına bağlı olarak tırnakların noksan aşınması, aşırı uzaması ve uzun zaman içerisinde deformasyonu ortaya çıkar. Oluşan deformasyonlara bağlı olarak, tırnaklara fizyolojik olmayan yüklenmeler tırnak duvarının ve tabanının canlı dokusunun eziklerine neden olur. Uzayan her bir tırnak arasında ahır pislikleri toplanır, buna bağlı olarak tırnak enfeksiyonları artar, bu da topallıklara, süt veriminin azalmasına ve hayvanın zayıflamasına neden olur (3,16,23).

Tırnakların düzenli aşınmasını sağlamak amacı ile hayvanların sürekli olarak bağlı tutulmasından vazgeçilmesi gerekir. Aralıklı zemin, beton taban, paslanmaz metal taban ve benzeri sert yürüme yerleri üzerinde hayvanların günlük ha-

Geliş Tarihi/Submission Date : 20.02.2018

Kabul Tarihi/Accepted Date : 26.02.2018

* Bu çalışma yüksek lisans tezinden özetlenmiştir. Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından TSY-09-701 nolu proje ile desteklenmiştir.

reketlerini yapmalarının sağlanması günümüzün güncel konuları içerisinde (10,22).

Zamanında yapılan tırnak bakım ve düzeltmeler ile gelecekteki büyük bozuklukların önüne geçilmiş olur. Özellikle çok keskin kenarlı tırnaklarla, kırılmış tırnaklar ve taban eziklerinin yetersiz sağaltımı ya da sağaltımın erken sonuçlandırılmaması, zamanla büyük bozuklukların oluşmasını sağlar (3,10,18,23).

Tırnakların bakımı büyük zorluklar göstermesine karşın, bakımsızlıkları da büyük ekonomik kayıplara yol açar. Tırnak sağlığı açısından; tırnağın düzenli aşınması, tırnağın su emme özelliğinin azaltılması, tırnak banyolarının temizleme ve dezenfekte etme özelliği olması, tırnakta yapılacak işlemlerin son gelişmelere uygun olması ve hayvanların her gün düzenli olarak yürütülmesi gerekir (17,24,29).

Süt sığırlarında yaygın olarak görülen tırnak bozuklukları arasında, tırnak yapısını etkileyen defermasyonlar, interdigital flegmon, interdigital dermatitis, digital dermatitis, beyaz çizgi hastalığı, taban ülseri yer almaktadır (12,22,29)

Bu çalışmada Kayseri ili Develi İlçe Merkezi Tarımsal Kalkınma Kooperatifi'nde bulunan Holstein ırkı sütçü ineklerin tırnak hastalıkları yönünden taranması, problemlili tırnakların tedavilerinin yapılması ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hayvan Materyali

Hayvan materyalini Develi İlçe Merkezi Tarımsal Kalkınma Kooperatifi süt sığırcılığı çiftliğinde bulunan 100 baş sağmal inekten tırnak bozukluğu bulunan 37 baş inek oluşturdu.

İneklerin tamamı Holstein ırkından olup yarı açık serbest dolaşmalı ahırlarda barınmaktaydılar. Ahırın kapalı kısmı beton zeminden olup, açık kısmı ise toprak zeminden oluştu. İnekler bireysel yataklıklarda olup, yataklıkların zemini kauçuk malzemeden yapılmıştı. Ahırın kapalı bölümü otomatik gübre sıyırıcı sistemi ile temizlenmekteydi.

İneklerin laktasyondaki süt ortalamaları 25-26 litreydi. İşletmede sağım tam otomatik sistemlerle günde üç kez yapılmaktaydı. Hayvanların vücut ağırlıkları (400-750 kg) ortalama 600 kg, yaşları ise (2-10 yıl) ortalama 5.5 yıl olarak tespit edildi. Çalışma öncesinde Erciyes Üniversitesi Etik Kurulu'ndan izin alındı (12.11.2008, 08/52).

Hayvanların Klinik Muayenesi

Çalışma kapsamına alınan her bir ineğin rutin

klinik muayenesi yapıldı. Hayvanların vücut ısısı, kalp-solunum sayıları ve genel iştah durumları kaydedildi.

Hayvanların Tırnak Muayenesi

Hayvanlar tek tek dururken ve yürütülerek topallık tespiti yapıldı. Ön ve arka bacaklarda topallık semptomu gösteren hayvanlar işletmede özel olarak yaptırılan tırnak muayene ve kesim bölümüne alındı. Tırnak muayeneleri ön ve arka bacak tırnaklarını kapsayacak şekilde sırasıyla yapıldı. Hayvanların ayakları bol suyla yıkandı ve fırça yardımıyla temizlendi. Gübre ve çamur kalıntılarından arındırıldı.

Tırnağın muayenesine inspeksiyonla başlandı. İnspeksiyonda tırnağın uzunluğuna, tırnağın taban ve duvarında şekillenen lezyon varlığına, renk değişimlerine, muhtemel taban kalınlaşmalarına ve korona bölgesindeki yangısel reaksiyonlara, apse ve fistül gibi oluşumlara bakıldı. İnspeksiyondan sonra tırnak muayene pensi yardımıyla tırnağın palpasyonu gerçekleştirildi. Tırnak tabanında ön, lateral, medial ve öççeler



Şekil 1A. Taban ülseri lateral tırnakta, B. Bandaj ve tahta takoz uygulanması

kısımında ağrının olup olmadığı not edildi. Uzun ve çift tabanlı tırnaklar renet, tırnak kerpeteni ve elektrikli çark yardımıyla kesilerek normal tırnak özelliği verildi.

Tırnak muayeneleri ve kesimleri özel olarak yaptırılmış tırnak kesim travaylarında yapıldı.

Tırnak Hastalıklarının Tedavi Protokolü

Taban Ülseri: Tırnak bölgesinin geniş çaplı temizliği yapıldıktan sonra intravenöz regional anestezi (İVRA) uygulanarak bölgesel anestezi yapıldı. Taban bölgesinde mevcut fazla doku ve granülasyon özelliğindeki dokular renet ile giderilerek ulcus açığa çıkarıldı. Lezyonlu ve nekrotik dokular uzaklaştırıldı (Şekil 1A). Lezyonlu bölgeye rivanol-katran-CuSO₄ 'den hazırlanan karışım tahta çubuk yardımıyla sürüldü. İlgili tırnak gazlı bez ve sargı bezi yardımıyla bandaja alındı. Sağlam olan tırnağa akrilik yapıştırıcı yardımıyla tahta takoz uygulandı (Şekil 1B). Beş gün parantral antibiyotik olarak ceftiofur hidroklorid (Excenel, Zoetis, ABD) uygulandı. Üç günde bir olmak üzere deri altı yolla D-Biotin (Gabiotan, Bayer, Almanya) yedi kez uygulandı. Bandaj üç günde bir olmak üzere 4 kez değiştirildi. Hayvanlar bol ve temiz altlıklı bireysel bölmeye alındı.

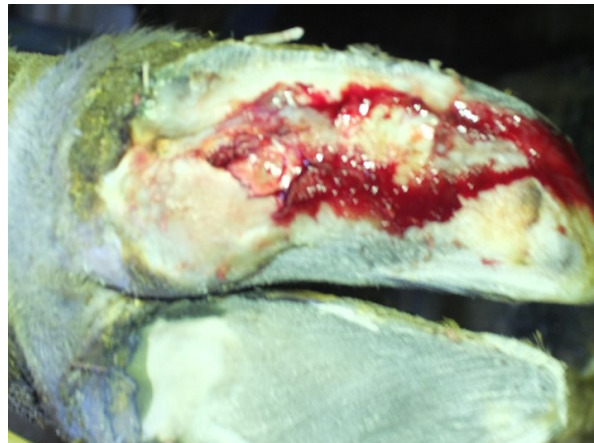
Ökçe Erozyonu: Ökçe erozyonu görülen tırnaklarda erozyonlu bölge renet yardımıyla temizlendi (Şekil 2). Uzun tırnaklar kesilerek düzeltildi. Erozyonlu bölgeye antibiyotikli sprej (Neocaf, MSD, İtalya) uygulanarak ilgili tırnak üç günde bir değiştirilmek üzere toplamda iki kez kuru bandaja alındı.



Şekil 2. Her iki tırnaktaki ökçe erozyonu

Beyaz Çizgi Hastalığı: Beyaz çizgi hastalığı tespit edilen hayvanlarda tırnağın lezyonlu kısımları temizlendi ve aşırı uzamış tırnaklar kesilerek düzeltildi (Şekil 3). Derin lezyonlu tırnaklara İVRA uygulandıktan sonra tırnak kesimine devam edildi. Lezyonlar V şeklinde açılarak temizlendi. Lezyonlu bölgeye rivanol-katran-CuSO₄ 'den hazırlanan karışım tahta çubuk yardımıyla sürüldü. Lezyonlu tırnak gazlı bez ve sargı bezi yardımıyla bandaja alındı. Sağlam olan tırnağa akrilik yapıştırıcı yardımıyla tahta takoz konuldu. Beş gün parantral antibiyotik uygulandı. Üç günde bir olmak üzere deri altı yolla D-Biotin üç kez enjekte edildi. Bandaj üç günde bir olmak üzere dört kez tekrarlandı. Hayvan bol ve temiz altlıklı bireysel bölmeye

alındı.



Şekil 3. Bir inekte beyaz çizgi hastalığı

alındı.

İnter Digital Flegmon: İnter digital flegmonlu hayvanlarda tırnaklar kesilerek düzeltildi. Tırnak topuk eklemine kadar 35 derece sıcaklığa varan antiseptikli ıslak bandaj ile günde bir uygulama olmak üzere dört kez tekrarlandı. Sonrasında bölgeye rezolitif pomat uygulaması yapıldıktan sonra tırnak bölgesi kuru pansumanla desteklendi. Uygulamaya bir hafta devam edildi. Beş gün parantral antibiyotik uygulandı. Deri altı yolla gün aşırı olmak üzere *Tarantula cubensis* ekstratı (Theranechron, Richter Pharma, Avusturya) üç kez uygulandı. İki günde bir yangı semptomlarını ortadan kaldırmak için antiinflammatuar ajan Carprofen (Rimadyl xl, Pfizer, ABD) intramuskuler (İM) uygulandı.

İnter Digital Dermatitis: İnter digital dermatitis tespit edilen ayaklarda lezyonlu bölge antiseptikli ılık suyla yıkanarak temizlendi. Ökçeler üzerinde bulunan böğürtlen tarzındaki lezyon odakları kürete edilerek bölgeye sprej (Quick-Hit, Erri-Comfort, Danimarka) tarzında püskürtülerek uygulandı. Uygulama sonrası tırnaklar kuru bandaja alındı. Tedavi ilk iki gün sabah ak-

şam, daha sonraki üç gün günde bir olmak üzere beş gün sürdürüldü. Parenteral olarak beş gün süre ile parenteral antibiyotik enjekte edildi.

Limaks: Limaks tespit edilen hayvanlarda İVRA yöntemiyle tırnağın lokal anestezisi yapıldı. İnter digital aralıkta doku üremesinin olduğu alana kavun dilimi tarzında ensizyon yapılarak granülasyon dokusu çevre dokulardan ayırt edilerek uzaklaştırıldı. Deri altı dokular ve deri usulüne uygun olarak kapatıldı. Daha sonra bölgeye rivanol ile ıslak kompres uygulandı ve bandaja alındı. Kompres uygulaması beş gün süreyle her gün yapıldı. Paranteral antibiyotik tedavisine üç gün boyunca devam edildi.

Akut Laminitis: Uzayan tırnaklar usulüne göre kesilerek düzeltildi. Laminitisin görüldüğü ayaklara bir hafta süreyle sabah akşam soğuk su banyosu yaptırıldı. Hayvanlara beş gün süresince İM antihistaminik (Histavet, Vetaş, Türkiye), Carprofen ve antibiyotik enjeksiyonu yapıldı. Hayvanlar bol ve temiz altlıklı bireysel bölmelere alındı. Rasyondaki konsantre yem miktarı azaltıldı ve bireysel besleme yapıldı.

Kronik Laminitis: Kronik laminitisli hayvanlarda tırnağın usulüne uygun olarak kesimi yapıldı. Tırnak kesimi esnasında lokal kepek görünümünde ve kıvamında tırnak artıkları gözlemlendi. Bu bölgeler renet yardımıyla temizlendi. Tırnaklara üç günde bir olmak üzere üç defa bandaj uygulaması yapıldı.

Bulgular

Klinik muayeneler sonucunda tırnak hastalığından başka her hangi bir hastalığa rastlanmadı. Çalışma kapsamına alınan hayvanların ortalama solunum sayısı 15-25 kalp atım sayısı 60-80, rektal vücut ısısı 38-39 derece olarak tespit edildi.

Yapılan değerlendirmelerin sonucunda elde edilen bulgular Tablo 1'de gösterilmiştir.

Taban Ülseri

Taban ülseri ve beyaz çizgi hastalığı tespit edi-

len hayvanlarda süt veriminde %40 düşüş, belirgin bir şekilde iştahta azalma ve basış topallığı gözlemlendi. Yapılan klinik incelemeler neticesinde 6 inekte taban ülseri olgusu tespit edildi. Taban ulkusu iki inekte sağ arka tırnağın lateralinde, bir inekte sol ön tırnağın medialinde ve üç inekte sol arka tırnakta ikisi lateralde ve biri medialinde olmak üzere tespit edildi.

Bandaj uygulamasına üç hafta süreyle devam edildi. Yirmi bir günün sonunda yapılan kontrollerde ulkusların tamamında iyileşme olduğu gözlemlendi. Taban ülser oluşumları iki olguda yumuşak ökçe bölgesine kadar yayıldığı gözlemlendi. Bu kısımların irrigasyonları yapıldı ve üç hafta sonunda ulkusun kapandığı gözlemlendi. Tırnak tabanını etkileyen ulkusların iki hafta içinde granülasyonla dolarak tabanın kapandığı ve topallığın kaybolduğu not edildi.

Ökçe Erozyonu

Beş inekte ökçe erozyonu tespit edildi. Toplamda iki kez uygulanan kuru bandaj ve uygun tırnak kesimi ile kırmızı renkte ve deformatif özellikte olan lezyonlu ökçe kısımları hızla iyileşti ve normal yapılarına kavuştukları gözlemlendi. Uygulama sonrası tüm tırnakların iyileştiği ve gözlemlenen bir topallığın olmadığı not edildi.

Beyaz Çizgi Hastalığı

Üç inekte gözlenen beyaz çizgi hastalığında lezyonlar canlı dokuya kadar ilerlemiş ve hayvanlarda belirgin basış topallığı vardı. Lezyonlar bir hayvanda tırnağın lateral tarafında bulunurken (3 cm) diğerlerinde medial tarafta yer aldı. Tırnağın nekrotik dokularının temizlenmesi, İVRA ile antibiyotik uygulaması iyileştirme sürecini hızlandırdı. Topallık iki hafta içinde kayboldu fakat tırnak dokusunda görülen defektlerin kaybolması bir ay devam ettiğinden dört defa tırnak takozu eşliğinde bandaj uygulamasına ihtiyaç duyuldu.

Tablo 1. Tırnak muayeneler sonucu saptanan tırnak hastalıkları

Hastalık Adı	Sağ Ön Ayak	Sağ Arka Ayak	Sol Ön Ayak	Sol Arka Ayak
Taban Ülseri	-	2	1	3
Ökçe Erozyonu	1	2	-	2
Beyaz Çizgi Hastalığı	1	1	-	1
İnt. Dig. Flegmon	-	3	1	2
İnt.Dig. Dermatit	1	3	1	2
Limax	-	-	-	1
Laminitis (Kronik)	2	3	2	2
Laminitis (Akut)	-	2	-	2
TOPLAM	5	16	5	15

İnter Digital Flegmon

İnter digital flegmon tespit edilen altı inekte interdigital bölge, korona ve topuk bölgesine kadar uzanan şişkinlik ve kızarıklık ile karakterize bir tablo vardı (Şekil 4). Hayvanların rektal vücut ısılarının 39-40 derece olduğu ve bölgesel ısı artışı ve basış topallığı saptandı. İştah azalması ve buldukları yerden kalkmada zorluk görül-



Şekil 4. İnter digital flegmon

dü. Tedavi sonrası üç defa yapılan ıslak bandaj uygulaması ile topallığın azaldığı ve bir hafta sonunda tamamen kaybolduğu not edildi.

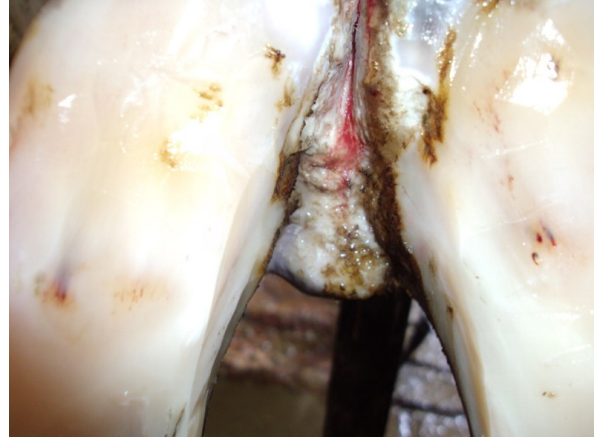
İnter Digital Dermatit

Yedi adet inter digital dermatit teşhisi konulan tırnaklardan beşinde lezyonların inter digital aralığı etkileyerek deri altı dokular yayıldıkları gözlemlendi ve bu hayvanlarda orta derecede basış topallığı mevcuttu. Lezyonlu bölgelerin irrigasyonu ile üç gün sonunda enfeksiyon kontrol altına alındı ve beş günün sonunda yedi hastalıklı



Şekil 5. Bir inekte inter digital dermatit

ayaktan altısında tam iyileşme görüldü. Diğer hayvanlarda ise iyileşme dokuz gün sonunda kaydedildi. Tedavi sonrası hiçbir hayvanda topallık gözlenmedi (Şekil 5).



Şekil 6. Bir inekte limaks

Limaks

Limaks operasyonu takiben bir gün sonra belirgin olan topallık bulguları ortadan kalktı (Şekil 6). Post operatif bir hafta sonra hayvanların süt veriminde belirgin artış oldu.

Akut Laminitis

Akut laminitis tespit edilen iki inekte belirgin şe-



Şekil 7. Bir inekte akut laminitis

kilde iştah azalması ve ruminal hareketlerde azalma kaydedildi. Hayvanların vücut ısısında artış, yürüyüşte isteksizlik, olduğu yerde sabit kalma ve tırnak palpasyonunun de belirgin ısı artı-

şı not edildi. Akut laminitis iki inekte kaydedildi (Şekil 7).

Akut laminitisli tırnakların tabanında bal mumu görünümünde lokal renk değişimlerinin olduğu belirlendi. Her iki inekte de arka ayakların topallığı belirgin olup, yürüyüşte isteksizlik ve lokal ısı artışı vardı. İneklerin medikal sağaltımını takiben üç gün sonra topallık belirtileri kayboldu. Lokal ısı artışında belirgin azalma gözlemlendi.

Kronik Laminitis

Kronik laminitisli hayvanlarda tırnağın usulüne uygun olarak kesimi yapıldı. Tırnak kesimi esnasında lokal kepek görünümünde ve kıvamında tırnak artıkları gözlemlendi. Tırnak kesimi sonrasında belirgin olarak tırnak mihankiyetinin düzeldiği saptandı.

Tartışma ve Sonuç

Sunulan projede, 100 baş sağmal Holstein ırkı ineğin muayenesi neticesinde tırnak bozukluğu tespit edilen 37 baş ineğin bilimsel ve güncel bilgiler ışığında tedavileri yapıldı.

Altı adet inekte taban ulkusu tespit edildi. Ulkusların daha çok arka ayak tırnaklarının lateralinde bulunması Murray ve ark. (20) 1996 yılında yaptığı araştırmada bildirdiği bulgulara paralellik gösterdi. Ulkuslu hayvanların tedavisinde kullanılan rivanol-katran-CuSO₄ karışımı (2,31) ve parenteral antibiyotik uygulaması neticesinde tüm hayvanlar üç hafta içerisinde iyileşme gösterdi ve süt verimi yönünden eski performanslarına yaklaştı. Söz konusu tedavi bandajlarla desteklenmiş ve üç günde bir olmak üzere bandajları değiştirildi. Bandajların değiştirilmesi saha uygulamalarında zor ve zaman alıcı olduğundan, pratik yapan hekimlerin uygun travaylar kullanması saha pratiği açısından kolaylık sağlayacaktır.

Hayvanların beş tanesinde ökçe erozyonu tespit edildi. Erozyonlu bölgeler renet yardımıyla temizlendi ve antibiyotikli sprey kullanıldı. Olguların tamamında iyileşme gözlemlendi. Bu tedavi şekli rutinde yapılan sağaltım olup diğer araştırmacıların bildirdiği şekilde uygulama yapılmıştır (29). Uygulamanın bandaj eşliğinde birkaç kez yapılması iyileşme sürecinin hızlanmasına neden olmuştur.

Beyaz çizgi hastalığı üç hayvanda tespit edildi. Bir hayvanda sağ ön medial, bir hayvanda sağ arka lateral ve bir tırnakta da sol arka medialde lokalize olmuştu. Lezyonlar V şeklinde açılarak temizlendi. Lezyonlu bölgeye rivanol-katran-CuSO₄ 'den hazırlanan karışım uygulandı. Lezyonlu tırnak gazlı bez ve sargı bezi yardımıyla

bandaja alındı. Sağlam olan tırnağa tahta takoz uygulandı. Beş gün parenteral antibiyotik uygulandı. Üç günde bir olmak üzere deri altı yolla D-Biotin üç kez uygulandı. Bandaj üç günde bir olmak üzere üç kez değiştirildi. Hayvan bol ve temiz altlıklı bireysel bölmeye alındı. Tedavi sonucunda olguların tamamında iyileşme görüldü. Söz konusu tedavi protokolü klinik pratikte hızlı ve etkin sonuçlar vermektedir (29). Özellikle deri altı yolla kullanılan D-Biotin boynuz tırnağın hızla onarımını sağlamakta ve iyileşmeyi hızlandırmaktadır.

İnter digital flegmon olgusu altı inekte görüldü. Üç inekte sağ arka, bir inekte sol ön ve iki inekte sol arka ayakta gözlemlendi. Lezyonun olduğu bölgeye 35 derece sıcaklığa varan antiseptikli kompres uygulandı. Bölgeye rezolitif pomat uygulaması yapıldıktan sonra tırnak bölgesi kuru pansumanla desteklendi. Uygulamaya beş gün devam edildi. Beş gün parenteral antibiyotik uygulandı. Deri altı yolla gün aşırı olmak üzere Terenekron üç kez uygulandı. Üç günde bir yangı semptomlarını ortadan kaldırmak için Rimadyl uygulandı. Bir haftanın sonunda hayvanların tamamında iyileşme gözlemlendi. Benzer tedavi protokolünü Murray ve ark. (20) uygulamış ve olgularının çoğunun iyileştiğini bildirmişlerdir. Therenekronun özellikle demarkasyon hattını oluşturmasını tedavinin başarılı olmasında etkin olduğu düşünülmektedir.

İnter digital dermatitis olgusu yedi inekte tespit edildi. Bir inekte sağ ön, üç inekte sağ arka, bir inekte sol ön ve iki inekte sol arka ayakta gözlemlendi. İnter digital dermatitis tespit edilen ayaklarda lezyonlu bölge antiseptikli ılık suyla yıkılarak temizlendi. Doku artıkları bölgeden uzaklaştırıldı. Lezyonlu bölgeye ticari solüsyon Quick-Hit sprey tarzında püskürtülerek uygulandı. Uygulama sonrası tırnaklar kuru bandaja alındı. Tedavi ilk iki gün sabah akşam, daha sonraki üç gün günde bir olmak üzere beş gün devam ettirildi. Beş günün sonunda yedi hastalıklı tırnaktan altısında tam iyileşme görüldü. İyileşme göstermeyen tırnağın tedavisine üç kez devam edildi ve tedavi sonrasında iyileşme gözlemlendi. İnter digital dermatitis olguları daha çok hijyenik olmayan ahır koşullarında gözlenmektedir (19), doğru tedavi seçeneği uygulandığında olguların büyük çoğunluğu iyileşmektedir (19,31).

Bir inekte sol arka ayakta limax olgusu tespit edildi ve İVRA yöntemiyle tırnağın lokal anestezi uygulandı. Oluşan doku üremesinin boyutu küçük olduğundan total ekstirpe edildi ve bölge-

ye rivanol ile ıslak kompres uygulanarak bacak bandaja alındı. Kompres uygulaması beş gün süreyle her gün yapıldı. Paranteral antibiyotik tedavisine üç gün boyunca devam edildi (1). Uygun bakım ve bandaj koşullarında tedavi başarılı bir şekilde yapılmaktadır. Kronik laminitis yedi inekte görüldü deformatif tırnaklar tırnak bakımı yapılarak düzeltildi. Olgularımızda ayak kemiğinin deviasyonu yoktu. Tırnağın düzeltilmesi ve lezyonların inceltirilerek giderilmesi tedavinin başarılı olmasına neden oldu.

Akut laminitis iki inekte gözlemlendi. Tırnağın usulüne uygun olarak kesimi yapıldı. Laminitisin görüldüğü ayaklara bir hafta süreyle sabah akşam soğuk su banyosu uygulandı. Hayvanlara gün aşırı olmak üzere üç kez antihistaminik ajan enjeksiyonu yapıldı. Hayvanlar bol ve temiz altlıklı bireysel bölmelere alındı. Rasyondaki konsantre yem miktarı azaltıldı ve bireysel besleme yapıldı. Bir haftanın sonunda topallığın ortadan kalktığı ve iyileşmenin tam olduğu not edildi. Akut laminitis olguları daha çok yemleme hatalarından kaynaklanmakta, rasyondaki konsantre yem oranının yüksek olması hastalığın ortaya çıkmasında neden olarak gösterilmektedir (6). Bu şekilde ortaya çıkan beslenme bozukluklarında bir sürüdeki hayvanların çoğu etkilenebilir (3). Önemli ölçüde et ve süt veriminde kayıplar oluşur. Rasyonların hayvanların verim düzeyine göre bilimsel yöntemlere göre hazırlanması önem arz etmektedir.

İVRA ön ayaklarda Vena digitalis palmaris communis II ve IV arka ayaklarda Vena digitalis dorsalis communis III ve IV ile Vena digitalis plantaris communis IV damarlarına lokal anestezi ajan uygulanması ile gerçekleştirilmiştir. Anestezisi istenilen düzeyde olup, cerrahi müdahaleye imkan vermiştir. İVRA'nın uygulanması neticesinde tırnak amputasyonları ve tırnağın canlı dokusuna yönelik operasyonlar ağrısız olarak yapılmaktadır (26). İVRA esnasında uygulanan garonun gevşek bırakılması anestezi madde kaybına neden olacağından anestezisi düzeyi istenilen düzeyde olmaz (11,14).

Tırnakların incelenmesi özel olarak tasarlanan bir travayda yapıldı. Ön ve ayak tırnakları travay içinde yeterince tespit edilebildi. Bildirilen birçok travay modeli vardır. Travayların hayvanların tırnak muayene ve operasyonlarına uygun ve kullanışlı olması ve hekimin iş gücünü kolaylaştırması gerekmektedir (27).

Tırnak hastalıklarına yanlış rasyon, tırnak bakımının düzenli yapılmaması, hijyenik olmayan

barınma koşulları ve barınak zeminlerinin bozuk olması gibi birçok faktörler sebep olmaktadır. Bu nedenle işletme sahiplerinin olası tırnak hastalıklarının önlenmesi bakımından bilinçlendirilmesi gerekmektedir (4,5).

Sonuç olarak; S.S. Develi İlçe Merkezi Tarımsal Kalkınma Kooperatifi süt sığırları çiftliğine ait sığırlar üzerinde gerçekleştirilen bu araştırmada ayak hastalıklarının insidansı %37 olarak belirlendi. Bu oran ülkemizde bildirilen oranlardan az da olsa yüksektir (1,5,18,23,27,30). Ancak yapılan çalışmadan elde edilen mevcut bulgular bu hastalıkların büyük oranda beslenme ve yetiştiricilikten kaynaklandığını ortaya koymuştur. Bu nedenle, ahır hijyeninin sağlanması, ayak banyolarının düzenli kullanılması, periyodik tırnak kesim ve bakımının yanı sıra çalışanların konuyla ilgili olarak bilinçlendirilmesinin ayak hastalıkları oranının düşürülmesinde önemli rol oynayacağı sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

1. Alkan İ, Boynukara B, Gençcelep M. Van ve yöresinde sığır ayak hastalıklarının yayılışı, nedenleri ve sağaltımı üzerine bir araştırma. Van Vet J 1993; 4(1): 87-95.
2. Amstutz HE. Bovine Medicine and Surgery Vol II. Second Edition. USA: American Veterinary Pub, 1980; pp, 1228-32.
3. Antepioğlu H, Samsar E, Akın F, Güzel N. Ayak Hastalıkları. Birinci Baskı. Ankara: AÜ Vet Fak Yayınları, 1992; p 414.
4. Arkins S, Hannan J, Sherigton J. Effects of formalin footbathing on foot diseases and claw quality in dairy cows. Vet Rec 1986; 118(1): 580-3.
5. Atasoy N. Erzurum yöresinde süt sığırlarında görülen ayak hastalıklarının insidansı ve bunların sağaltımı. Van Vet J 2003; 14(1): 1-5.
6. Baggot DG, Russel AM. Lameness in cattle. British Vet J 1977; 137(1): 113-32.
7. Baran V. Sığırlarda tırnak bozuklukları ve bunların neden olduğu taban ulkuslarının sağaltımında antibiyotik ve enzim uygulamaları. Kafkas Univ Vet Fak Derg 1991; 3(2): 201-10.
8. Belge A, Gönenci R. Sütçü sığırlarda subklinik laminitis, taban lezyonlarının değerlendirilmesi. Vet Cer Derg 2001; 7(1): 83-4.
9. Blowey RW, Done SH, Cooly W. Observation on the pathogenesis of digital dermatitis in cattle. Vet Rec 1994; 135(5): 115-7.
10. Chaplin SJ, Tierney G, Stockwell C, Logue

- DN, Kelly M. An evaluation of mattresses and mats in two dairy units. *Appl Anim Behav Sci* 2000; 66(4): 263-72.
11. Clarkson MJ, Downham DY, Faull WB, Hoghes JW, Manson FJ, Ward WR. Incidence and prevalence of lameness in dairy cattle. *Vet Rec* 1996; 138(1): 563-7.
 12. Çeçen G. Sığırlarda topallık ve ayak hastalıkları. Birinci Baskı. Bursa: Sentez, 2014; p.168.
 13. Demirkan İ. Mortellaro hastalığı (interdigital dermatitis) genel perspektif. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 1995; 3(11): 123-5.
 14. Dietz O, Gangel H, Woborill J. Intravenous local antibiotic treatment for infectious diseases of the hoof and claw in cattle. *Monatsh Veterinarmed* 1980; 35(19): 729-34.
 15. Enting H, Kooij D, Dijkhuizen AA, Huirne RBM, Noordhuizen-Stassen EN. Economic losses due to clinical lameness in dairy cattle. *Livest Prod Sci* 1997; 49(3): 259-67.
 16. Fabian J, Laven RA, Whay HR. The prevalence of lameness on New Zealand dairy farms: A comparison of farmer estimate and locomotion scoring. *Vet J* 2014; 201(1): 31-8.
 17. Görgül OS. Sığırlarda tırnak bakımı ve ayak hastalıkları sebep ve sonuç ilişkileri. *ÜÜ Vet Fak Derg* 1988; 7(1): 1-2.
 18. Güzel N, Erden H. Aydın yöresi sığırcılık işletmelerinde ayak hastalıklarının dağılımı. *Vet Cer Derg* 2000; 6(3-4): 8-10.
 19. İzci C, Avki S. Sığır Ayak Hastalıkları. Birinci Baskı. Konya: Sarışen Offset, 1998; s. 98.
 20. Murray RD, Downham DY, Clarkson MJ, Faull WB, Hughes JW, Manson FJ, Meritt JB, Russel WB, Sutherst JE, Ward WR. Epidemiology of lameness in dairy cattle: Description and analysis of foot lesions. *Vet Rec* 1996; 138(1): 586-91.
 21. Nordlund KV, Cook NB, Oetzel GR, 2004: Investigation strategies for laminitis problem herds. *J Dairy Sci* 2004; 87(E Suppl): E27-E35.
 22. Kılıç N. Hoof lesions of dairy cattle in Turkey. *Indian Vet J* 2004; 81(1): 1053-4.
 23. Ormancı S. Van ve yöresinde süt sığırlarında ayak hastalıklarının nedenleri, dağılımı, ve sağaltımı üzerinde çalışmalar. *YYÜ Sağl Bil Derg* 2001; 7(1-2): 139-45.
 24. Šárová R, Stěhulová I, Kratinová P, Firla P, Špinka M. Farm managers underestimate lameness prevalence in Czech dairy herds. *Anim Welfare* 2011; 20(2): 201-4.
 25. Sprecher DJ, Hostetler DE, Kaneene JB. A lameness scoring system that uses posture and gait to predict dairy cattle reproductive performance. *Theriogenology* 1997; 47(6): 1179-87.
 26. Steiner A, Ossent P, Mathis G. Intravenous regional anesthesia and antibiotic therapy applied to the limbs of cattle. Indications, techniques and complications. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1990; 132(5): 227-37.
 27. Şındak N, Keskin O, Bircik HS, Sertkaya H. Şanlıurfa yöresinde sığır ayak hastalıklarının prevalansı. *Van Vet J* 2003; 14(1): 14-8.
 28. Tadich N, Flor E, Gren L. Associations between hoof lesions and locomotion score in 1098 unsound dairy cows. *Vet J* 2010; 184(1): 60-5.
 29. Yavru N, Özkan K, Elma E. Ayak Hastalıkları ve Ortopedi. Birinci Baskı. Ankara: SÜ Vet Fak Yay. Basım Ofset Matbaası, 1989.
 30. Yücel R. İstanbul ve Tekirdağ bölgesindeki sığırlarda görülen ayak hastalıklarının toplu bir değerlendirilmesi. *ÜÜ Vet Fak Derg* 1982; 8(1): 47-61.
 31. Weaver AD. *Bovine Surgery and Lameness*. First Edition. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1986; pp 187-90.

Sorumlu Yazar:

Prof. Dr. Gültekin ATALAN
Erciyes Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Cerrahi Anabilim Dalı,
Kayseri-TÜRKİYE
Email:gatalan@erciyes.edu.tr



Antioxidant Effects of Pomegranate Seed Oil Against Pentachlorophenol Toxicity in Rat Tissues*

Zeynep SOYER SARICA¹, Mürsel KARABACAK², Murat KANBUR³, Gökhan ERASLAN³,
Bilal Cem LİMAN³, Muhammet Yasin TEKELİ³

¹Erciyes Üniversitesi, Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi,
Kayseri-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi, Safiye Çıkrıkçıoğlu Meslek Yüksek Okulu, Hayvan Sağlığı Bölümü,
Kayseri-TÜRKİYE

³Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Ana Bilim Dalı,
Kayseri-TÜRKİYE

Abstract: This study was conducted to evaluate the effects of pomegranate seed oil PSO on the oxidative stress induced by pentachlorophenol PCP in rats. Forty Sprague-Dawley, 4-5 months old, 300g male rats were used in this study. Rats were assigned to four groups each containing 10 animals. First group was control group; no administration was made to animals in this group. Second, third and fourth groups were given PSO at a dose of 0.15 ml/kg bw, PCP at a dose of 40 mg/kg bw and PSO at a dose of 0.15 ml/kg bw+PCP at a dose of 40 mg/kg bw orally by gavage for 28 days, respectively. At the end of the study, brain, liver, kidney, testicle and spleen samples were collected. Malondialdehyde (MDA) level and catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) activities were measured in tissue samples. PCP caused an increase of MDA level in brain, kidney, liver and testicle; a decrease of CAT activity in liver and spleen; a decrease of GSH-Px activity in brain and testicle and a decrease of SOD activity in brain, liver and kidney compared to control group. When PSO+PCP group compared to PCP group, MDA level decreased in brain, liver and testicle; CAT activity increased in spleen; SOD activity increased in brain and kidney. When compared to the control group and the group given PSO+PCP, the data of PSO+PCP group were generally similar to the control group. As a result, administration of PCP at the dose of 40 mg/kg bw for 28 days caused oxidative stress and administration of PSO at the dose of 0.15 ml/kg bw alleviated severity of PCP induced oxidative stress.

Key words: Oxidative stress, pentachlorophenol, pomegranate seed oil, rat

Rat Dokularında Pentaklorofenol Toksisitesine Karşı Nar Çekirdeği Yağının Antioksidan Etkileri

Özet: Bu çalışma ratlarda pentachlorophenol PCP'nin oluşturduğu oksidatif stres üzerine nar çekirdeği yağının (NÇY) etkilerinin değerlendirilmesi için yapıldı. Çalışmada 4-5 aylık, ortalama 300 g ağırlığında 40 adet Sprague-Dawley ırkı erkek sıçan kullanıldı ve her birinde 10 hayvan olmak üzere dört grup oluşturuldu. İlk grup kontrol olarak belirlendi ve herhangi bir uygulama yapılmadı. İkinci, üçüncü ve dördüncü gruba sırasıyla 0.15 ml/kg ca dozunda NÇY, 40 mg/kg ca dozunda PCP ve 0.15 ml/kg ca dozunda NÇY ile 40 mg/kg ca dozunda PCP 28 gün boyunca gavaj yolu ile mideye uygulandı. Çalışmanın sonunda beyin, karaciğer, böbrek, testis ve dalak dokuları alındı. Doku örneklerinde malondialdehit (MDA) düzeyi ile katalaz (CAT), glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve superoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri ölçüldü. Pentaklorofenolün kontrol grubuna göre, beyin, karaciğer, böbrek ve testiste MDA düzeyinde yükselme; karaciğer ve dalak CAT aktivitesinde azalma; beyin ve testis GSH-Px aktivitesinde azalma; beyin, böbrek ve karaciğer SOD aktivitesinde azalmaya neden oldu. NÇY+PCP verilen grup PCP verilen grupla karşılaştırıldığında beyin, karaciğer ve testis MDA düzeyinde azalma; dalak CAT aktivitesinde yükselme; beyin ve böbrek SOD aktivitesinde yükselmeye yol açtı. NÇY+PCP verilen grup ve kontrol grubu karşılaştırıldığında, NÇY+PCP grup verileri genel olarak kontrol grubuyla benzerdi. Sonuç olarak, ratlara 28 gün 40 mg/kg ca dozda verilen PCP'nin dokularda oksidatif strese yol açtığı; 0.15 ml/kg ca dozda uygulanan NÇY'nin, PCP kaynaklı oksidatif stresin şiddetini azalttığı belirlendi.

Anahtar kelimeler: Nar çekirdeği yağı, oksidatif stres, pentaklorofenol, rat

Introduction

Pomegranate (*Punica granatum L.*, *Punica-*

ceae) is known as a plant with valuable effects since ancient times. It can be seen from India to Iran even to south west sides of America. First usage of pomegranate is to have anti-inflammatory, antioxidant and antiparasitic effects. These effects could be originated from phenolic compounds, anthocyanins, tannins and alkaloids (6,11). Pomegranate is known to have beneficial effects for health since ancient ages;

Geliş Tarihi/Submission Date : 14.01.2017

Kabul Tarihi/Accepted Date : 13.03.2018

*This study has no financial support. Some of the data given in this article were presented as a poster presentation in International Congress of the Russian Laboratory Animal Science Association (RUSLASA) and International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS), Science-based assessment of laboratory animal welfare, 2014, St. Petersburg, Russia.

it is a plant whose bark of tree, peel of fruit, flower, juice of fruit and seeds are utilized. The seed of pomegranate contains active component such as monoacylglycerols, linoleic acid, linolenic acid, glycerides, sterols, campesterol, γ -tocopherol, 17- α -estradiol and macro nutrients such as protein, pectin and sugar (6,12,18,26,28,30,32). Another active ingredient which is found in high proportion in pomegranate oil is punicic acid (tricosanic acid), which is a long chain fatty acid, coming to the forefront with its anticarcinogenic effects (9,11,22,26,28). The density of this seed oil is 0.9202 to 0.9311 g/cm³(16). Pomegranate seed oil (PSO) has hypoglycemic effects as well as anticarcinogenic effects. It is believed that this effect is related to punicic acid (6). Punicic acid contains the 74-85% of total PSO oil content (14). Herbal sterols (eg. betacytosterol, campesterol, stigma sterol) are also reported to be rich in PSO (total 4089-6205 mg/kg oil) (28). Ellagic acid which is also an anticarcinogenic and antioxidant substance is found at a highly proportion in PSO. PSO is also rich in vitamin E (26).

Pentachlorophenol (PCP) is a substance used in industrial fields like wood and wood products, paper, leather, textile, paint, glue, plastic, photography, yarn and nylon due to its insecticide, fungicide, bactericide, herbicide and molluscicide effects (48). The oral LD₅₀ is 25-210 mg/kg bw in rats, 74-130 mg/kg bw in mice and 70-300 mg/kg bw in rabbits. PCP can be also toxic through respiratory tracts. This substance which is also toxic for aquatic organisms can accumulate up to 10000 times in the body of creatures like fish, algae, and invertebrates compared to water (29,38,48). The target organs in PCP exposure are liver, kidney and bone marrow (38). The most important target tissue is liver. Depending on the exposed dose, in addition to the some changes in the biochemical parameters, hepatic P450 enzyme activities, liver weight and in the liver microscopy are also observed (24,25,29,38,49). PCP has also toxic effects on kidneys. Kidney enlargement and some microscopic changes like interstitial nephritis, hyperemia, glomerular atrophy were seen in the milk cows who had PCP added to their feed (31,48). In poisoning cases, changes also occur in blood. The substance has been shown to cause anemia in cows and led to a decrease in erythrocyte count, hemoglobin concentration and hematocrit values in rats (27,38). Previous stud-

ies have shown that PCP affects especially brain (1,20), liver (46), kidney (1), testis (4) and spleen (7). Therefore, studies were carried out in these tissues. In this study, we aimed to investigate the possible antioxidant and protective effects of PSO on lipid peroxidation induced by PCP in various tissues of rats.

Materials and Methods

Animals

All the procedures with animals in this study were approved by from Erciyes University Experimental Research and Application Center (Approval date and number: 17.12.2008-08/74). Forty, sixteen weeks old Sprague-Dawley male rats weighing of 300 g in the same condition were selected (Erciyes University Experimental Research Center). They were provided with adequate commercial feed (Produced by Purina, Düzce, Turkey) and tap water. The rats were arranged in four groups and each group were arranged four cages (25 cm width by 40 cm length by 20 height). Each of the cages contained two or three rats and provided coarse sawdust bedding (Kayseri, Turkey). Rats were housed under conventional experimental animal housing conditions with controlled temperature (23±2 °C), humidity (50±5%), air change (12 air change per hour), room had an equal 12 h of light and darkness and ad libitum feed. General health status of the rats was monitored prior, during and at the end of the study. In this study, cold pressed PSO containing meristic acid (0.09%), palmitic acid (3.29%), palmitoleic acid (0.12%), margaric acid (0.05%), stearic acid (2.13%), oleic acid (8.66%), linoleic acid (5.81%), linolenic acid (0.06%), arachidic acid (0.42%), ecosanoic acid (0.70%) and punicic acid (78.67%) indicated on the product was used (Obtained From Bükaş®, İzmir, Turkey; 50 ml cold press oil). PCP sodium salt (Fluka 76480) was used and this compound was dissolved in distilled water.

Experimental Protocol

Rats were randomly divided into four groups and each group contains 10 rats. Group I is control group and no administration was made. Group II received PSO (0.15 ml/kg bw), group III received PCP (40 mg/kg bw) and group IV was administrated PSO+PCP (0.15 ml/kg bw+40 mg/kg bw) intragastrically using a 22 G ball tip needle for 28 days, respectively. Applied PSO and PCP doses are determined from previous studies (1,8,24,38,44,48). Twenty four

hours after the last administration, tissue samples from brain, liver, kidney, testis and spleen of the rats were collected under light ether anaesthesia. The removed organs were washed with cold distilled water. Afterwards the fat tissue on the organs was removed. These tissue samples were homogenized with phosphate buffer, at pH 7.4 (Heidolph, Silent Crusher M). The homogenized tissues were centrifuged at 20000 rpm for 1 hours at + 4 °C and the supernatants were transferred to Eppendorf tubes. All samples were stored at -80 °C till analysis. Protein analysis was employed in accordance with the method modified by Miller (37) and based on the method of Lowry (33). The measurement of MDA levels of all tissues are determined by the method reported by Ohkawa (39); the estimation of SOD activities by Sun's method (45), the estimation of CAT activities by Luck's method (34) and the estimation of GSH-Px activities

USA). Differences of groups were compared using One-way ANOVA and Duncan's test. The data were given as mean±standart deviations (SD) and values of $p < 0.05$ were considered as statistically significant.

Results

MDA: When compared control group, there is no significant statistical changes on MDA levels of all tissues in PSO group ($P > 0.05$). When PCP group compared to the control group, it was seen an increase of brain, liver, kidney and testis MDA levels at PCP group ($P < 0.05$). When control and PCP+PSO group was compared, no statistical change in brain and spleen MDA levels was determined ($P > 0.05$) but statistical decrease in liver, kidney and testis MDA levels of PCP+PSO was observed ($P < 0.05$). Compared with the PCP and PCP+PSO groups, brain, liver and testis MDA levels were statistically significant ($P < 0.05$) (Table 1).

Table 1. MDA levels in rat tissue of control and experimental groups (nmol/mg protein).

Tissue	Group (n:10) (Control)	Group II (n:10) (PSO)	Group III (n:10) (PCP)	Group IV (n:10) (PSO+PCP)	P
Brain	11.39±1.2 ^a	12.40±2.1 ^a	18.79±2.7 ^b	14.68±3.5 ^a	$P < 0.05$
Liver	1.77±0.3 ^a	1.95±0.4 ^a	3.78±0.7 ^c	2.77±0.2 ^b	$P < 0.05$
Kidney	3.20±0.6 ^a	3.24±0.5 ^a	5.67±0.5 ^c	4.61±1.3 ^{bc}	$P < 0.05$
Testis	3.81±0.7 ^a	4.21±0.6 ^{ab}	7.77±1.6 ^c	5.53±0.8 ^b	$P < 0.05$
Spleen	6.32±1.4	7.03±1.2	8.11±0.3	7.15±1.1	$P > 0.05$

(*) Different letters of the groups in the same line are statistically significant ($P < 0.05$).

PSO: Pomegranate seed oil, PCP: Pentachlorophenol, PSO+PCP: Pomegranate seed oil and pentachlorophenol.

by Paglia's method (40) was performed. All analysis of samples was assayed as spectrophotometrically (Helios Alpha UV-Vis spectrophotometer). The units of MDA levels, the activities of SOD, CAT and GSH-Px were expressed as nmol/mg protein, U/mg protein, k/g protein and U/g protein, respectively.

Statistical analysis

The statistical analysis was made with SPSS for Windows version 15.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL,

CAT: When compared to the control group, no significant changes were observed in the CAT activities of the PSO group on all tissues ($P > 0.05$). When compared to between control and PCP group, CAT activities of liver and spleen decreased at PCP group ($P < 0.05$). When compared to control and PCP+PSO group, there were no significant differences ($P > 0.05$). When compared to PCP and PCP+PSO groups, CAT activities decreased in

Table 2. CAT activities in rat tissue of control and experimental groups (k/g protein).

Tissue	Group I (n:10) (Control)	Group II (n:10) (PSO)	Group III (n:10) (PCP)	Group IV (n:10) (PSO+PCP)	P
Brain	44.97±18.8	46.45±19.8	57.05±11.3	52.50±6.5	$P > 0.05$
Liver	210.67±42.5 ^b	199.35±14.6 ^b	146.5±28.1 ^a	177.62±20.5 ^{ab}	$P < 0.05$
Kidney	177.68±53.1	191.61±54.5	180.10±28.5	186.96±43.1	$P > 0.05$
Testis	44.54±14.8	56.40±9.9	40.18±15.2	42.52±8.51	$P > 0.05$
Spleen	43.02±21.8 ^b	42.44±14.5 ^b	17.02±3.0 ^a	39.9±11.4 ^b	$P < 0.05$

(*) Different letters of the groups in the same line are statistically significant ($P < 0.05$).

spleen tissue of PCP group ($P < 0.05$) (Table 2).

GSH-Px: When the control group was compared with the PSO group, there was no significant change in brain, liver and kidney of GSH-Px activities ($P > 0.05$) but there were statistically increase in testis and spleen tissues of PSO group ($P < 0.05$). When control and PCP group was compared, it was seen significant decrease on GSH-Px activities in brain and testis of PCP group ($P < 0.05$). There was no significant difference in liver, kidney, testis and spleen GSH-Px activities between control and PCP+PSO groups but significant difference has brain tissue ($P < 0.05$). When PCP and PSO+PCP group are compared, there was no significant difference on GSH-Px activities of PSO+PCP group ($P > 0.05$) (Table 3).

SOD: When control and PSO group were compared, there were no significant changes in all

Discussion and conclusion

Pomegranate (*Punica granatum L.*) which is thought to have no significant adverse effects is a widely used plant in many cultures (35). According to this positive effect, in recent studies it is proposed that PSO is good alternative for food supplement or dietary supplements (6). Faria et al. (19) reported that, the levels/activities of GSH and GSH-Px, SOD, and CAT in liver were decreased in rats that were fed with pomegranate juice ad libitum for 4 weeks compared to the control group, whereas lipid peroxidation did not cause a significant change in hepatic MDA levels which is considered as the most important oxidative stress marker (19). According to a study, because of oxidative stress, antioxidant enzyme activities such as SOD, CAT and GSH-Px significantly decreased compared to control group and also the admin-

Table 3. GSH-Px activities in rat tissue of control and experimental groups (U/g protein).

Tissue	Group I (n:10) (Control)	Group II (n:10) (PSO)	Group III (n:10) (PCP)	Group IV (n:10) (PSO+PCP)	P
Brain	226.48±43.3 ^b	299.34±53.5 ^b	122.9±24.3 ^a	126.65±11.5 ^a	$P < 0.05$
Liver	139.04±28.3 ^{ab}	150.95±33.6 ^b	113.61±21.7 ^a	136.52±10.7 ^{ab}	$P < 0.05$
Kidney	126.66±30.8 ^{ab}	159.73±47.6 ^b	92.92±19.1 ^a	107.79±12.3 ^a	$P < 0.05$
Testis	111.70±15.1 ^b	185.09±15.1 ^c	89.04±11.4 ^a	97.30±9.4 ^{ab}	$P < 0.05$
Spleen	205.88±26.5 ^a	280.58±36.5 ^b	181.31±78.0 ^a	200.23±30.74 ^a	$P < 0.05$

(*) Different letters of the groups in the same line are statistically significant ($P < 0.05$).

tissues SOD activities ($P > 0.05$). Comparing control and PCP group, there was significant decrease in SOD activities of brain, liver and kidney of PCP group ($P < 0.05$). When PCP and PSO+PCP group were compared, it was observed that brain and kidney SOD activities increased at PCP+PSO group ($P < 0.05$) (Table 4).

istration of α -eleostearic acid and punicic acid was observed to support the cellular antioxidant defence mechanism by modulating the activity of these antioxidant enzyme against the oxidative stress (42). According to another study, pomegranate juice extract (200 μ g gallic acid equivalent/mouse/day) was administrated to mice for 2 weeks and positively affected on cel-

Table 4. SOD activities in rat tissue of control and experimental groups (U/mg protein).

Tissue	Group I (n:10) (Control)	Group II (n:10) (PSO)	Group III (n:10) (PCP)	Group IV (n:10) (PSO+PCP)	P
Brain	5.21±0.3 ^a	5.09±0.7 ^a	3.41±0.5 ^b	4.99±0.6 ^a	$P < 0.05$
Liver	2.97±0.7 ^b	3.25±0.3 ^b	1.97±0.4 ^a	2.57±0.6 ^{ab}	$P < 0.05$
Kidney	3.84±0.6 ^b	3.65±0.4 ^b	2.19±0.5 ^a	3.07±0.6 ^b	$P < 0.05$
Testis	6.82±2.1 ^{ab}	7.14±1.5 ^b	4.90±0.7 ^a	6.22±0.5 ^{ab}	$P < 0.05$
Spleen	2.59±0.8	2.50±0.5	2.24±0.2	2.45±0.5	$P > 0.05$

(*) Different letters of the groups in the same line are statistically significant ($P < 0.05$).

lular oxidative stress (2). Antioxidant activities of pomegranate juice is evaluated and compared to green tea and red wine, and it was reported that pomegranate juice which is presented to public consumption, has rich aryl content and antioxidant activities are 3 times higher than the green tea and red wine. This potent antioxidant activity attributed to tannins which can be hydrolysable of pomegranate juice main antioxidant compound, and also to anthocyanins and ellagic acid derivatives (21). In this presented study, it was observed that the administration of PSO at a dose of 0.15 ml/kg bw for 28 days to rats increased GSH-Px activities in the testis and spleen without any significant negative effect on lipid peroxidation. Elevation of testis and spleen GSH-Px activities may be related to the accumulation of PSO at more high levels in these tissues. As mentioned in earlier studies this effect can be associated with especially punicic acid which is conjugated linoleic acid presence in PSO compound (51). Different parts of pomegranate have different antioxidant properties, 12-20% of the total seed weight can be oil, and 80% of these oils contain conjugated fatty acid. Apart from these compounds, such as sterols, steroids are also found in minor compounds which form the main components of the nervous system. Pomegranate products have antibacterial, antiviral, antidiabetic and anticancer effects (32). Pomegranate extracts have effects like scavenging free radicals, reducing oxidative stress. This oil increases plasma antioxidant capacity and reduces cellular oxidative stress products and increases the levels of decreased GSH (5,26,32,41). In the studies regarding the protective effects of pomegranate products on experimental models of toxicity and disease, administration of pomegranate extract in liver-damaged rats caused elevation in CAT, SOD and GSH-Px enzyme activities and reduction in the formation of lipid peroxidation products in the liver (13). It was reported that administration of pomegranate extract to streptozotocin-induced diabetic rats, significantly reduced pancreatic MDA levels and brought the levels of GSH and the activities of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GSH-Px) similar to the control group (3). Another study stated that pomegranate tea was administered to rats and the MDA levels in liver, kidney, brain and heart tissues were shown to be elevated in the trichloroacetic acid exposed group and that the stated param-

eters were approached towards the control values in the PSO+TCA group. They noted that the antioxidant and protective effects of PSO may be associated with the fatty acids present in its content (15). Previous study Soyer-Sarica and Liman (44) noted that was decreased serum MDA and NO levels and erythrocyte SOD activities compared to the PCP group and PCP+PSO group, whereas erythrocyte CAT and GSH-Px activities was elevated. It has also shown that PSO administration reduced renal MDA levels in studies previously performed on kidney damage induced by different compounds in experimental animals (8-11).

The present study, when PSO+PCP group was compared to PCP group, it was observed that the MDA levels in brain, liver, and testis significantly decreased; CAT activity in spleen and SOD activity in brain and kidney significantly increased. When the control group was compared to the PSO+PCP group, the parameters examined were found to be similar to the control group. These results show that PSO reduces the severity of PCP-induced oxidative stress. These beneficial effects may be related to active substances, which are found at high levels in PSO, known to be protective against free radical damage. On the other hand the antioxidant effects of PSO can be attributed to active ingredients such as conjugated linoleic and linolenic fatty acids, flavonoids and vitamin E as mentioned in previous studies (6,12,18). In addition, fatty acids such as gallic acid, ellagic acid and punicic acid; flavonols and flavonol glycosides like quercetin, kaempferol, luteolin and apigenin; anthocyanins like delphinidin, cyanidin and pelargonidin; amino acids like methionine, valine and proline has protective features (3,9,13,15,32).

PCP is a compound which has a wide spectrum of biocidal activity, which is widely used as antifungal, especially in the wood industry, and which continues to have a residue problem in the nutrients due to its extremely slow degradation in the environment (5,20). PCP is carcinogenic and genotoxic in various experimental animals and that these effects may be mediated by free oxygen radicals resulting from its biotransformation in the liver (43,50). Chlorophenols studies as a metabolism poison. ATP production is reduced without effecting the electron transport chain in mitochondria. Thus, the oxidative phosphorylation is used in the body heat

instead of the energy metabolism that breaks the chain. With increasing body heat, metabolism increases and the cycle continues with acceleration. (27,17,29). PCP increases hepatic CYP-P450 enzyme levels, thus leading to the formation of free radicals (47). In present study, the MDA levels in brain, kidney, liver and testis were increased in the PCP group compared to the control group whereas the CAT activity in liver and spleen; GSH-Px activity in brain and testes; SOD activity in brain, liver and kidney were decreased. The results of the study indicate that PCP causes oxidative stress in the brain, liver, kidney and testes. As mentioned in previous study, the lipid peroxidative effects of PCP in tissues can be attributed to the production of free radicals due to increased CYP-P450 enzyme activity (47). Various enzymes such as SOD, CAT and GSH-Px are involved in the inactivation of free radicals. SOD reduces the superoxide radical to a less oxidizing agent H_2O_2 , whereas GSH-Px and CAT inactivate H_2O_2 formed by SOD (23,36). In this study, decrease in antioxidant enzyme activities can be associated with excessive availability of free radicals produced by PCP exposure in the biological system.

In conclusion, it was determined that administration of PSO at the dose of 0.15 ml/kg bw dose for 28 days had no adverse effects on oxidant/antioxidant balance in rats, administration of PCP at the dose of 40 mg/kg bw for 28 days caused oxidative stress in brain, kidney, liver and testicular tissues in rats and administration of PSO at the dose of 0.15 ml/kg bw had a alleviating effect on the severity of PCP induced oxidative stress. In this context, pomegranate can be used as a supportive care in combination with other medical treatment options for PCP poisoning. As well as other preventive approaches, when there is a risk of exposure to PCP poisoning, it may be given as food supplement to minimize the toxic effects.

References

1. Akilli M, Eraslan G. Effects of *Origanum vulgare* oil on oxidative stress in pentachlorophenol-intoxicated rats. *Fresenius Environ Bull* 2016; 25(1): 121-9.
2. Aviram M, Volkova N, Raymond C, Dreher M, Reddy MK, Ferreira D, Rosenblat M. Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic: Studies in vivo in atherosclerotic apolipoprotein e-deficient (E 0) mice and in vitro in cultured macrophages and lipoproteins. *J Agric Food Chem* 2008; 56(3): 1148-57.
3. Bagri P, Ali M, Aeri V, Bhowmik M, Sultana S. Antidiabetic effect of *Punica granatum* flowers: Effect on hyperlipidemia, pancreatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Food Chem Toxicol* 2009; 47(1): 50-4.
4. Beard AP, Bartlewski PM, Chandolia RK, Honaramooz A, Rawlings NC. Reproductive and endocrine function in rams exposed to the organochlorine pesticides lindane and pentachlorophenol from conception. *J Reprod Fertil* 1999; 115(2): 303-14.
5. Bernard BK, Hoberman AM. A study of the developmental toxicity potential of pentachlorophenol in the rat. *Int J Toxicol* 2001; 20(6): 353-62.
6. Białek A, Stawarska A, Bodecka J, Białek M, Tokarz A. Pomegranate seed oil influences the fatty acids profile and reduces the activity of desaturases in livers of Sprague-Dawley rats. *Prostag Oth Lipid M* 2017; 131: 9-16.
7. Blakley BR, Yole MJ, Brousseau P, Boermans H, Fournier M. Effect of pentachlorophenol on immune function. *Toxicology* 1998; 125(2-3): 141-8.
8. Boroushaki MT, Arshadi D, Jalili-Rasti H, Asadpour E, Hosseini A. Protective effect of pomegranate seed oil against acute toxicity of diazinon in rat kidney. *Iran J Pharm Res* 2013; 12(4): 821-7.
9. Boroushaki MT, Asadpour E, Sadeghnia HR, Dolati K. Effect of pomegranate seed oil against gentamicin-induced nephrotoxicity in rat. *J Food Sci Technol* 2014a; 51(11): 3510-4.
10. Boroushaki MT, Mollazadeh H, Rajabian A, Dolati K, Hoseini A, Paseban M, Farzadnia M. Protective effect of pomegranate seed oil against mercuric chloride-induced nephrotoxicity in rat. *Ren Fail* 2014b; 36(10): 1581-6.
11. Boroushaki MT, Rajabian A, Farzadnia M, Hoseini A, Poorlashkari M, Taghavi A, Dolati K, Bazmandegan G. Protective effect of pomegranate seed oil against cisplatin-induced nephrotoxicity in rat. *Ren Fail* 2015; 37(8): 1338-43.
12. Caligiani A, Bonzanini F, Palla G, Cirilini M, Bruni R. Characterization of a potential nut-

- raceutical ingredient: Pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil unsaponifiable fraction. *Plant Foods Hum Nutr* 2010; 65(3): 277-83.
13. Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK, Singh RP. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo models. *J Agric Food Chem* 2002; 50(17): 4791-5.
 14. Çavdar HK, Yanık DK, Gök U, Göğüş F. Optimisation of microwave-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil and evaluation of its physicochemical and bioactive properties. *Food Technol Biotechnol* 2017; 55(1): 86-94.
 15. Çelik I, Temur A, Isık I. Hepatoprotective role and antioxidant capacity of pomegranate (*Punica granatum*) flowers infusion against trichloroacetic acid-exposed in rats. *Food Chem Toxicol* 2009; 47(1): 145-9.
 16. Dadashi S, Mousazadeh M, Emam-Djomeh, Mousavi SM. Pomegranate (*Punica granatum* L.) seed: A comparative study on biochemical composition and oil physicochemical characteristics. *IJABBR* 2013; 1(4): 351-63.
 17. Dökmeci İ, Dökmeci AH. Toksikoloji: Zehirlenmelerde Tanı ve Tedavi. Dördüncü Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2005; s. 602.
 18. Elfalleh W, Tlili N, Nasri N, Yahia Y, Hannachi H, Chaira N, Ying M, Ferchichi A. Antioxidant capacities of phenolic compounds and tocopherols from Tunisian pomegranate (*Punica granatum*) fruits. *J Food Sci* 2011; 76(5): 707-13.
 19. Faria A, Monteiro R, Mateus N, Azevedo I, Calhau C. Effect of pomegranate (*Punica granatum*) juice intake on hepatic oxidative stress. *Eur J Nutr* 2007; 46(5): 271-8.
 20. Folch J, Yeste-Velasco M, Alvira D, de la Torre AV, Bordas M, López M, Sureda FX, Rimbau V, Camins A, Pallàs M. Evaluation of pathways involved in pentachlorophenol-induced apoptosis in rat neurons. *Neurotoxicology* 2009; 30(3): 451-8.
 21. Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem* 2000; 48(10): 4581-9.
 22. Grossmann ME, Mizuno NK, Schuster T, Clearly MP. Punicic acid is an ω -5 fatty acid capable of inhibiting breast cancer proliferation. *Int J Oncol* 2010; 36(2): 421-6.
 23. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press, 1989; p. 139.
 24. Jiang P, Wang J, Zhang J, Dai J. Effects of pentachlorophenol on the detoxification system in white-rumped munia (*Lonchura striata*). *J Environ Sci* 2016; 44: 224-34.
 25. Jiang P, Wang J, Sheng N, Wei D, Dai J. Effects of pentachlorophenol on the quail (*Coturnix japonica*) liver detoxification pathway. *Chemosphere* 2017; 177: 44-50.
 26. Jurenka JS. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): A review. *Altern Med Rev* 2008; 13(2): 128-44.
 27. Kahn CM, Line S. *The Merck Veterinary Manual*. Tenth Edition. New Jersey: M Merck and Co, 2010; p. 2633-4.
 28. Kaufman M, Weisman Z. Pomegranate oil analysis with emphasis on MALDI-TOF/MS triacylglycerol fingerprinting. *J Agric Food Chem* 2007; 55(25): 10405-13.
 29. Kaya S. Pestisidler. Kaya S, Piriñçi İ, Bilgili A. eds. In: *Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji*. İkinci Baskı. Ankara: Medisan Yayınevi, 2002; s. 385.
 30. Kaya S: *Tıbbi Botanik ve Tıbbi Bitkiler*. Ankara: Medisan Yayınevi, 2008, s.91.
 31. Kinzell JH, Ames NK, Sleight SD, Krehbiel JD, Kuo C, Zabik MJ, Shull LR. Subchronic administration of technical pentachlorophenol to lactating dairy cattle: performance, general health, and pathologic changes. *J Dairy Sci* 1981; 64(1): 42-51.
 32. Lansky EP, Newman RA. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol* 2007; 109(2): 177-206.
 33. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
 34. Luck HS. Catalase. Bergmeyer HU, eds. *Methods of Enzymatic Analysis*. London: Academic Press, 1965; 885-94.
 35. Meerts IA, Verspeek-Rip CM, Buskens CA, Keizer HG, Bassaganya-Riera J, Jouni ZE, van Huygevoort AH, van Otterdijk FM, Van de Waart EJ. Toxicological evaluation of pomegranate seed oil. *Food Chem Tox* 2009; 47(6): 1085-92.

36. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *YYU Vet Fak Derg* 2004; 15(1): 91-6.
37. Miller GL. Protein determination for large numbers of samples. *Anal Chem* 1959; 31: 964.
38. National Toxicology Program. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Pentachlorophenol (CAS NO. 87-86-5) in F344/N Rats (Feed Studies), 1999.
39. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Reaction of linoleic acid hydroperoxide with thiobarbituric acid. *J Lipid Res* 1978; 19: 1053-7.
40. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70(1): 158-69.
41. Rosenblat M, Volkova N, Coleman R, Aviram M. Pomegranate by product administration to apolipoprotein E-deficient mice attenuates atherosclerosis development as a result of decreased macrophage oxidative stress and reduced cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein. *J Agric Food Chem* 2006; 54(5): 1928-35.
42. Saha SS, Ghosh M. Ameliorative role of conjugated linolenic acid isomers against oxidative DNA damage induced by sodium arsenite in rat model. *Food Chem Toxicol* 2010(12); 48: 3398-405.
43. Sai-Kato K, Umemura T, Takagi A, Hasegawa R, Tanimura A, Kurokawa Y. Pentachlorophenol-induced oxidative DNA damage in mouse liver and protective effect of antioxidants. *Food Chem Toxicol* 1995; 33(10): 877-82.
44. Soyer-Sarıca Z, Liman BC. Ratlarda pentaklorofenol zehirlenmesinde nar çekirdeği yağının lipid peroksidasyonu ve biyokimyasal parametrelere etkileri. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 2016; 13(2): 109-19.
45. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34(3): 497-500.
46. Umemura T, Kai S, Hasegawa R, Sai K, Kurokawa Y, Williams GM. Pentachlorophenol (PCP) produces liver oxidative stress and promotes but does not initiate hepatocarcinogenesis in B6C3F1 mice. *Carcinogenesis* 1999; 20(6): 1115-20.
47. Umemura T, Kuroiwa Y, Kitamura Y, Ishii Y, Kanki K, Kodama Y, Itoh K, Yamamoto M, Nishikawa A, Hirose M. A crucial role of Nrf2 in in vivo defense against oxidative damage by an environmental pollutant, pentachlorophenol. *Toxicol Sci* 2006; 90(1): 111-9.
48. United States Environmental Protection Agency, Reregistration eligibility decision for pentachlorophenol. EPA Report 739-R-08-008, 2008.
49. Villena F, Montoya G, Klaasen R, Fleckentein R, Suwalsky M. Morphological changes on nerves and histopathological effects on liver and kidney of rats by pentachlorophenol (PCP). *Comp Biochem Physiol* 1992; 101(2): 353-63.
50. World Health Organization International Programme on Chemical Safety, "Environmental Health Criteria 71- Pentachlorophenol", WHO IPCS Report, 1987.
51. Yamasaki M, Kitagawa T, Koyanagi N, Chujo H, Maeda H, Kohno-Murase J, Imamura J, Tachibana H, Yamada K. Dietary effect of pomegranate seed oil on immune function and lipid metabolism in mice. *Nutrition* 2006; 22(1):54-9.

Sorumlu Yazar:

Dr. Zeynep SOYER SARICA

Erciyes Üniversitesi,

Deneysel Araştırmalar Uygulama ve

Araştırma Merkezi,

Kayseri-TÜRKİYE

Tel:0352 20076666/24414

E-posta:zeynepsoyer_94@hotmail.com



Düşük Doz Kapsaisin Uygulanan Sıçanların Ovaryumlarında TGF-Beta 1'in İmmunohistokimyasal Yerleşimi

Cansel Güzin ÖZGÜDEN AKKOÇ, Ender Deniz ASMAZ, Tuncay İLHAN, Berrin ZİK

Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Bursa-TÜRKİYE

Özet: Transforme edici büyüme faktörü-beta1 (TGF-β1), ovaryum fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Sunulan çalışmada, sıçan ovaryumlarında düşük doz kapsaisin (KAP) uygulamasının, follikülogenezis ve atrezi sürecinde TGF-β1 ekspresyonuna etkisinin olup/olmadığı incelendi. Otuz adet 21 günlük dişi Sprague-Dawley sıçan üç eşit grubu ayrıldı. İlk gruba hiçbir enjeksiyon yapılmadı (kontrol A grubu), ikinci gruba (deney grubu) taşıyıcı solüsyon içinde eritilen KAP (0.5 mg/kg/gün) enjeksiyonu yapıldı, üçüncü gruba (kontrol B grubu) sadece taşıyıcı solüsyon (0.1 mg/kg/gün) enjeksiyonu yapıldı. Onbeş günlük uygulama periyodundan sonra hayvanlar eter inhalasyonu ile uyutularak ovaryumları alındı ve rutin histolojik prosedür uygulandı. TGF-β1, işaretli streptavidin-biotin tekniği kullanılarak gösterildi. Deney grubunda oositler, tüm folliküllerin (primordiyal, primer, sekonder, preantral, antral folliküller) granuloza hücreleri, teka hücreleri ve intersitisyel hücreler pozitif boyandı. Kontrol grubundaki boyanmada genel olarak deney grubuna benzerdi, fakat preantral ve antral folliküllerin granuloza hücrelerinde boyanma yoktu. Deney grubundaki TGF-β1 boyanması, kontrol gruplarından daha yoğundu. Deney ve kontrol gruplarında atretik folliküllerde TGF-β1 ekspresyonu gözlenmedi. Sonuç olarak, CAP, follikülogenezis sırasında ovaryan hücrelerdeki kendi reseptörüne bağlanarak TGF-β1 ekspresyonunu artırmıştır.

Anahtar kelimeler: İmmunohistokimya, kapsaisin, ovaryum, sıçan, TGF-Beta1

Immunohistochemical Localization of TGF-Beta1 in Low Dose Capsaicin Treated Rat Ovary

Summary: Transforming growth factor beta-1 (TGF-β1) plays an important role in regulation of ovarian functions. In the present study, it was investigated whether low dose capsaicin (CAP) administration in rat ovaries was effected on TGF-β1 expression during folliculogenesis and atresia. Thirty 21-day-old female Sprague-Dawley rats were divided randomly into three groups. The first group received no treatment (control A group), the second group received (0.5 mg/kg/day) CAP dissolved in the vehicle (experimental group), and the third group was treated with the (0.1 mg/kg/day) vehicle only (control B group). After 15 days treatment period, animals were euthanized by ether inhalation and ovarian tissues were sampled and processed routinely. TGF-β1 was demonstrated by labeled streptavidin-biotin technique. Oocytes, granulosa cells of all follicles (primordial, primer, secondary, preantral and antral follicles), theca cells and interstitial cells were stained positively in experimental group. In control group, the staining was generally in similar fashion but there was no staining in granulosa cells of preantral and antral follicles. TGF-β1 staining was more intense in experimental group than both control groups. There was no TGF-β1 staining in experimental group and control groups' atretic follicles. As a result, we demonstrated that binding of CAP to its receptor in ovarian cells resulted with increased TGF-β1 expression during the folliculogenesis.

Key word: Capsaicin, immunohistochemistry, ovary, rat, TGF-Beta1

Giriş

Transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF-β) süper ailesinin üyeleri, ovaryumda önemli olan pek çok olayın düzenlenmesinde anahtar rol oynarlar (46). TGF-β ailesi, 112 amino asitten oluşan, aynı büyüklükteki TGF-β1, TGF-β2 ve TGF-β3 olmak üzere üç alt ünite içeren, 25 kDa ağırlığındaki peptidlerdir (27). Bu aile; hücre çoğalması ve farklılaşması, apoptozis, hücre dışı matriks üretimi, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, yaraların iyileşmesi ve erken embriyonik gelişim gibi sayısız biyolojik aktiviteyi düzenlemektedir (2, 33). Dişi genital sistem üzerine yapılan çalışmalarda, TGF-β süper ailesinin et-

kili olduğu, oositlerde, granuloza hücrelerinde ve teka hücrelerinde folliküllerin gelişim aşamalarıyla ilişkili olarak ifade olduğu bildirilmektedir (17). Aynı zamanda granuloza ve teka hücre çoğalması/atrezisi, steroidogenezis, oosit olgunlaşması, ovulasyon ve luteinizasyonda intraovarian düzenleyici moleküller olarak işlev gördüğü ifade edilmektedir (17, 31, 37). Memelilerde tanımlanan TGF-β1, TGF-β2 TGF-β3'ün ekspresyonu türler arasında farklılık göstermektedir. Bazı türlerde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği (23), bazı türlerde ise diğer büyüme faktörlerinin etkisi altında granuloza ve teka hücrelerinde proliferasyonu uyardığı belirtilmektedir (4, 35).

Acı bibere acılığı veren etken madde kapsaisin

(trans -8- methyl-N- vanillyl-6-nonendamid), Capsicum bitki ailesine ait olup, reseptörü olan Vanilloid Reseptör 1 (VR1) aracılığıyla, sensorik sinir sonlarından vazodilatatör etkili P maddesi (SP) ve Kalsitonin Gen İlişkili Peptid (CGRP) gibi nöropeptidlerin salınımını uyararak analjezik etki göstermektedir (47). KAP ağrı giderici etkisinin yanında, immun (32), gastrointestinal (15), kardiovasküler ve solunum sistemleri (45, 48) olmak üzere pek çok sistem üzerine etkilidir. Son yıllarda fizyolojik ve farmakolojik etkilerinden dolayı tıp alanı ve ilaç sanayinde kullanımı yaygınlaşmıştır (8, 11). KAP'ın etkisi dozuna, uygulama şekline ve dokuya göre değişiklik göstermekte ve KAP'ın iki yönlü etkisi olduğu belirtilmektedir (40). Düşük konsantrasyonda KAP sensorik sinirleri etkileyerek nöropeptitlerin salınımını uyarırken, yüksek doz KAP nörotoksik etkilidir (19).

Yapılan taramalarda KAP'ın ovaryum üzerine etkileri ile ilgili yeterli sayıda çalışmaya rastlanamamıştır. Alatriste ve ark. (1) kobaylara, yüksek dozda KAP uygulamasının, puberteyi geciktirdiğini ve ovaryumdaki preantral ve antral folliküllerin sayısını azalttığını bildirmişlerdir. Buna karşılık Moran ve ark. (24) yüksek doz (50 mg/kg) KAP'ın sıçanların puberteye gelme sürelerini etkilemediğini fakat yavrulama sayılarında azalma olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar (24), KAP uygulanan sıçanların ovaryumlarında sağlıklı follikül sayılarının azaldığını, atretik follikül sayılarının ise kontrol gruplarına göre arttığını gözlemişlerdir. Nance ve ark. (25) da yüksek dozda KAP uygulamasının, köitus sırasında nöyroendokrin refleksin bozulmasına yol açtığını, dolayısıyla serviks uterusinin sensorik uyarım eksikliğinin, fertilité üzerine olumsuz etki yaptığını bildirmişlerdir. Yüksek doz KAP'ın ovaryum üzerine etkileriyle ilgili çalışmalar mevcutken, düşük doz uygulamalarıyla ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır. Özer ve ark. (30), civciv rasyonlarına %1 oranında kırmızı acı biber ilave ederek, genital sistem organlarının daha hızlı gelişip puberteye daha erken girdiklerini gözlemişler ve kırmızı acı biberin biyolojik aktivatör bir madde olduğunu belirtmişlerdir.

Zık ve ark. (49) da sıçanlara uyguladıkları düşük doz KAP'ın (0.5 mg/kg) folikülleri atreziden koruduğunu, foliküllerin gelişimini ve granuloza hücre proliferasyonunu uyardığını belirtmişlerdir. Sınırlı sayıda yapılan çalışmalarla, düşük doz KAP'ın ovaryum üzerinde olumlu yönde etkileri olduğu belirlenmiştir (43, 49).

Yapılan literatür taramasında KAP uygulanmış hayvanlarda, ovaryumda follikülogenezis ve atrezide önemli rol oynayan TGF-β1 ekspresyonu üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır. Dolayısıyla sunulan çalışmada, düşük doz KAP uygulamasının ovaryumda TGF-β1 ekspresyonu üzerine etkisinin olup/olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Deneysel Uygulama

Çalışmada, Uludağ Üniversitesi, Deney Hayvanları Yetiştirme, Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 21 günlük 30 adet Sprague-Dawley ırkı dişi sıçan kullanıldı. Laktasyon sürecini tamamlayan 21 günlük sıçanlar, follikül gelişiminin yoğun olduğu puberte dönemine kadar 15 gün boyunca ad libitum, pelet şeklindeki standart sıçan yemi ile beslendiler, içme suyunu serbest olarak tükettiler ve 12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık periyodunda tutuldular, ayrıca klima ile buldukları oda sıcaklığı 21–23 °C, nem ise %50–60 oranında sabitlendi. Çalışmadaki tüm deneysel işlemler Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (UÜ HADYEK) tarafından onaylandı (Karar no: 2005/2).

Hayvanlar; hiçbir enjeksiyon yapılmayan (kontrol A grubu n: 10), KAP'ın eritildiği taşıyıcı solüsyonun enjekte edildiği (kontrol B grubu n: 10) ve KAP (Sigma M2028) enjekte edilen (deney grubu n: 10) olmak üzere 3 gruba ayrıldı. KAP, %10 Tween 80 (Merck 817061), %10 absöüt ethanol (Merck 100983) ve %80 steril distile su içeren solüsyonda eritildi ve bu eritme için hazırlanan solüsyon kontrol B grubu için kullanıldı (0.3 ml/sıçan). Her gün, tüm gruptaki hayvanlar tartıldı ve grupların ortalama vücut ağırlıkları günlük olarak belirlendi. KAP, hayvanların vücut ağırlıklarındaki artış göz önüne alınarak, enjeksiyon öncesi her gün taze olarak hazırlandı. Eritilen KAP, toplamda 0.3 ml içinde 0.5 mg/kg dozda olacak şekilde, subkutan yolla, deney grubundaki sıçanlara 15 gün süresince enjekte edildi. Deney sonunda, dokuların alınacağı gün hayvanlara enjeksiyon yapılmadı.

Histolojik Prosedür

Onbeş gün devam eden deney sonrasında, hayvanlar eter inhalasyonu ile uyutularak karın bölgeleri açıldı ve her iki ovaryum alındı. Ovaryumlar numaralandırılmış kasetler içerisinde % 10'luk tamponlanmış nötral formalin solüsyonuna alınarak 24 saat tespit edildi. Tespit solüsyonunda bulunan ovaryumlar, değişik derecelerde (%50, 70, 80, 90, absöüt) alkol, ksilol ve parafin

Tablo 1. Ovaryum foliküllerinin sınıflandırılması (44).

Folikül Sınıfları	Oosit	Oositi Çevreleyen Folikül Epitel Hücreleri
Primordiyal Folikül	Primer Oosit	Tek katlı yassı pregranuloza hücreleri ve en fazla bir tane kübik granuloza hücresi içerir.
Primer Folikül	Primer Oosit	Tek katlı, iki ya da daha fazla sayıda kübik granuloza hücresi içerir.
Sekonder Folikül	Primer Oosit	İki ya da üç katlı kübik granuloza hücresi içerir.
Preantral Folikül	Primer Oosit	Üç kattan daha fazla granuloza hücresi içerir. Antrum şekillenmemiştir ya da granuloza hücreleri arasında küçük aralıklar oluşmuştur.
Antral Folikül	Primer Oosit	Çok katlı granuloza hücreleri içerir ve antrum şekillenmiştir.

serisinden geçirilerek, 58-60 °C'de eriyen parafinle bloklandılar. Parafin bloklardan elde edilen kesitlere, yapısal özelliklerin tespit edilebilmesi için Mallory'nin Crossmonn tarafından modifiye edilen üçlü boyama (7) ve immunohistokimyasal boyama tekniği uygulandı (42).

İmmunohistokimyasal Prosedür

Parafin bloklardan 5 µm kalınlığındaki kesitler lizinli lamlara alınarak, indirekt streptavidin-biotin-peroksidaz kompleks yöntemi (42) ile boyandı ve ışık mikroskopunda (Nikon Eclips 80i, Tokyo, Japonya) incelendi.

İmmunohistokimyasal boyamada, rabbit poliklonal TGF-β1 (Santa Cruz, sc-90) primer antikor, Histostain Plus Bulk (Zymed 85-6743) sekonder antikor kiti kullanıldı. Kesitler deparafinize edildikten sonra suyu giderildi ve proteoliz için distile su içerisinde hazırlanan %0.05 Saponin (Serva, Heidelberg, Almanya) solüsyonu içerisinde 20 dakika oda ısısında bekletildi. Fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkamayı takiben endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için, dokular %3'lük hidrojen peroksit solüsyonu içerisinde 10 dakika bekletildi. PBS ile yıkamayı takiben kesitler spesifik olmayan protein bağlanmalarını önlemek amacıyla sekonder kit içerisindeki bloking serum reagent A (Histostain Plus Bulk / Zymed Laboratuvarları, ABD) ile oda ısısında 60 dakika muamele edildi. Daha sonra kesitlere 1/750 dilüsyondaki primer antikor damlatılarak +4 °C'de bir gece bekletildi. Bu arada negatif kontrol grubu dokularına sadece PBS solüsyonu damlatıldı. Kesitler biotinlenmiş sekonder antikor damlatılarak oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi ve yıkamayı takiben streptavidin-HRP komplekste oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Son aşamada kromojen olarak 3,3'-diaminobenzidine (DAB- Zymed Laboratuvarları, ABD) kullanıldı ve hematoksilin ile zıt boyama yapılarak preparatlar entellan yapıştırıcı ile kapatıldı.

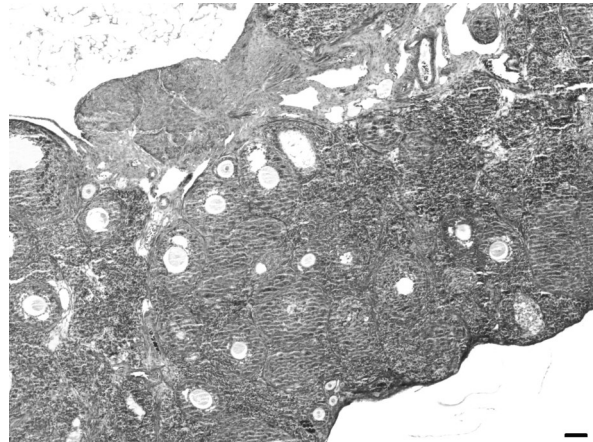
Foliküllerin Morfolojik Sınıflandırması

Çalışmada folliküller, klasik follikül sınıflandırması göz önüne alınarak sınıflandırılmıştır (44). Bu sınıflandırmada, granuloza hücre şekli ve hücre katman sayısı göz önüne alınmıştır (Tablo 1).

Bulgular

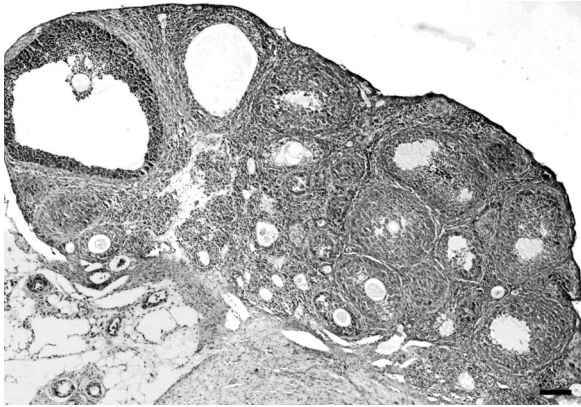
Histolojik Bulgular

Çalışma süresince deney ve kontrol gruplarını oluşturan hayvanlarda ölüm gözlenmedi. Kontrol ve deney gruplarına ait sıçanların ovaryum dokuları incelendiğinde herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı. Ayrıca mikroskopik değerlendirmede deney grubu ovaryumlarının, kontrol gruplarındaki ovaryumlara oranla daha büyük olduğu gözlemlendi. Her üç gruba ait hayvanların ovaryumlarının germinatif epitel ile çevrili olduğu ve bununda altında tunika albuginea bulunduğu görüldü. Ovaryumların zona parankimatoza bölümünde değişik gelişim aşamasında olan folliküller, (primordiyal, primer, sekonder, preantral, antral, graf folikülleri) atretik foliküller ve bu foliküller arasında da intersitisyel hücreler gözlemlendi (Şekil 1).



Şekil 1. Kontrol grubu ovaryumlarının genel görünümü, üçlü boyama. Bar 100 µm

Deney grubundaki hayvanlara ait ovaryumlarda, gelişmekte olan follüküllere rastlanmakla birlikte özellikle büyük antral/graff follüküllerin, kontrol gruplarına göre sayıca daha fazla olduğu gözlemlendi. Kontrol A ve kontrol B grubuna ait ovaryumlarda ise, gelişmekte olan follüküllerin çok sayıda olduğu, büyük antral/graff follüküllerin ise deney grubuna göre daha az sayıda olduğu dikkati çekti. Her üç gruptaki ovaryumlarda da korpus luteum gözlenmedi (Şekil 2).

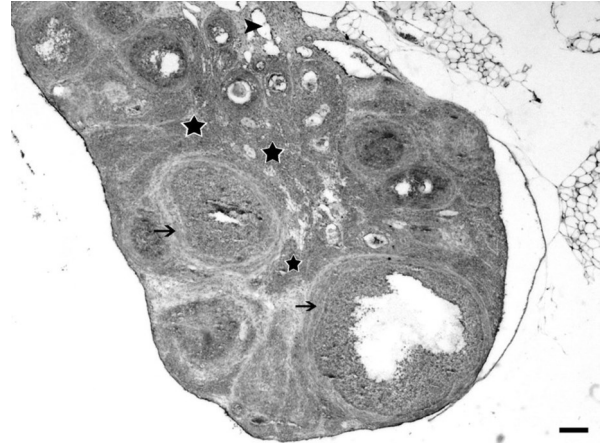


Şekil 2. Deney grubu ovaryumunun genel görünümü, üçlü boyama. Bar 100 µm.

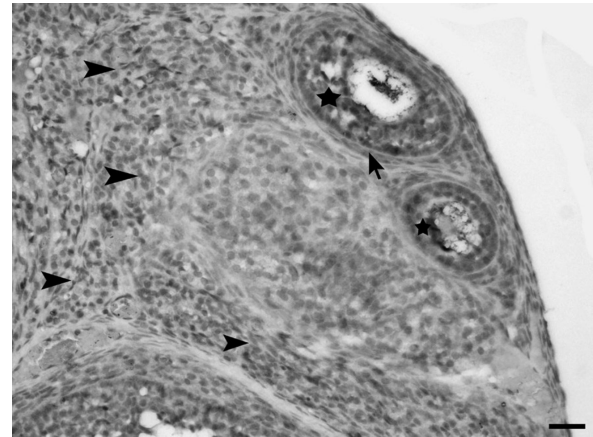
İmmunohistokimyasal Bulgular

TGF-β1 immunreaksiyonu, tüm grupların ovaryumlarında; oositte, granuloza hücreleri, teka hücreleri ve intersitisyel hücrelerde farklı şiddetlerde belirlendi (Şekil 3, Tablo 2). TGF-β1, hücre içerisinde, farklı boyanma yoğunluğunda intrasitoplazmik tarzda gözlemlendi (Şekil 4).

Kontrol grupları ve deney grubunun ovaryumlarında tek katlı prizmatik germinatif epitel, şiddetli TGF-β1 immunpozitif reaksiyon gösterdi. Ayrıca tüm grupların follüküllerinde bulunan oosit sitoplazmalarında şiddetli immunpozitif reaksiyon belirlendi (Şekil 5). Tüm grupların ovaryumunda yer alan atretik follüküllerde TGF-β1 ekspresyonu gözlenmedi. Kontrol gruplarının ovaryumlarında gelişmekte olan follükül-



Şekil 3. Deney grubuna ait ovaryum dokusunda TGF-β1 immunreaksiyonunun genel görünümü. Yıldız: intersitisyel alanı, ince ok: teka hücreleri, ok başı: atretik follüküller. Bar 100 µm.



Şekil 4. Deney grubuna ait ovaryum dokusunda intrasitoplazmik tarzda görülen TGF-β1 immunreaksiyonu. Ok başı: intersitisyel alan, ok: teka hücresi, yıldız: granuloza hücreleri. Bar 25 µm.

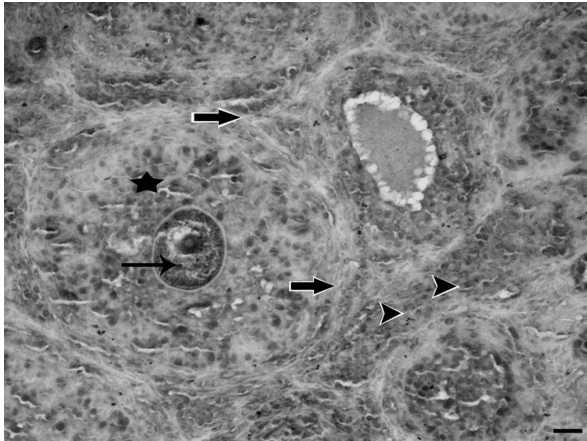
pları ovaryumunda yer alan atretik follüküllerde TGF-β1 ekspresyonu gözlenmedi. Kontrol gruplarının ovaryumlarında gelişmekte olan follükül-

Tablo 2. Kontrol ve deney gruplarında TGF-β1'in immunohistokimyasal boyanma değerleri

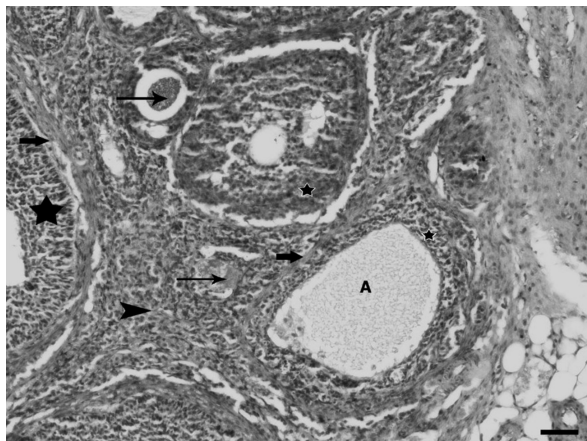
	Oosit	Sitoplazması	Granuloza Hücreleri		Teka Hücreleri	İntersitisyel Hücreler	Atretik Follüküller
			PO, P, S	PA, A			
Kontrol A Grubu (n:10)	+++	+	-	+	++	-	
Kontrol B Grubu (n:10)	+++	+	-	+	++	-	
Deney Grubu (n:10)	+++	+++	+++	+++	+++	-	

PO:Primordiyal Follükül, P: Primer Follükül, S: Sekonder Follükül, PA: Preantral Follükül, A: Antral Follükül
-: boyanma yok, +: Hafif düzeyde boyanma, ++: Orta düzeyde boyanma, +++: Şiddetli düzeyde boyanma

lerin granuloza hücrelerinde ve follikül epitel hücrelerinde TGF- β 1 immunreaksiyonu hafif şiddette gözlenirken (+1), büyük folliküllerin (preantral ve antral folliküllerin) granuloza hücrelerinde TGF- β 1 ekspresyonu gözlenmedi (Şekil 5). Deney grubunda ise gelişmekte olan folliküllerin (primordiyal, primer, sekonder) granuloza hücrelerinde şiddetli immunreaksiyon (+3) gözlenirken, büyük folliküllerin granuloza hücrelerinde orta şiddette (+2) immunreaksiyon belirlendi (Şekil 6). Kontrol gruplarında folliküllerin teka hücrelerinde TGF- β 1 ekspresyonu hafif şiddette (+1) belirlendi, buna karşılık deney grubunda şiddetli immunreaksiyon (+3) gözleildi. İntersitisyel hücrelerde ise TGF- β 1 ekspresyonu kontrol gruplarında orta (+2), deney



Şekil 5. Kontrol grubuna ait ovaryum dokusunda TGF- β 1 immunreaksiyonu. İnce ok: sekonder folikülün oosit sitoplazması, yıldız: granuloza hücreleri, ok başı: intersitisyel alan, kalın ok: teka hücreleri. Bar 25 μ m.



Şekil 6. Deney grubuna ait ovaryum dokusunda TGF- β 1 immunreaksiyonu. Ok başı: intersitisyel alan, küçük yıldız: sekonder follikül ve atretik (A) folliküllerin granuloza hücreleri, büyük yıldız: büyük folliküllerin granuloza hücreleri, ince ok: oosit sitoplazması, kalın ok: teka hücreleri. Bar 50 μ m.



Şekil 7. Deney grubuna ait ovaryum dokusunda TGF- β 1 immunreaksiyonu. İnce ok: antral follikül oosit sitoplazması, yıldız: granuloza hücreleri, kalın ok: teka hücreleri, ok başı: intersitisyel alan. Bar 50 μ m.

grubunda ise şiddetli (+3) olarak gözleildi (Şekil 5,7).

Tartışma ve Sonuç

Ovaryumda follikülogenez ve atrezi, endokrin sistemi, bağışıklık sistemi, sinir sistemi ve parakrin-otokrin faktörlerin de dahil olduğu pek çok mekanizmalarla düzenlenmektedir (28, 29, 39). Ovaryumlar sinirsel innervasyondan oldukça zengindir. Duyusal innervasyon, ovaryum fonksiyonunun düzenlenmesinde anahtar bir rol oynamakla birlikte, afferent sinirler, gonadotropinlere karşı follikülogenez ve atrezinin düzenlenmesinde aktif rol alırlar (24). Ovaryumu innerve eden KAP'a duyarlı sensorik sinir sonları da, gonadotropinlere cevapta ovaryumda follikülogenezin ve atrezinin düzenlenmesine katılmaktadırlar (3). Sinirsel innervasyondan oldukça zengin olan ovaryumda düşük doz KAP'ın etkilerini inceleyen çok az çalışma mevcuttur. Sunulan çalışmada düşük doz KAP'ın, ovaryum follikülogenezisi ve atrezisinde önemli rol oynayan TGF- β 1'in ekspresyonu üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Yapılan çalışmada düşük doz KAP'ın ovaryumda TGF- β 1 ekspresyonunu arttırdığı gözleildi. TGF- β 1 ekspresyonu, ovaryumdaki folliküllerin oositlerinde, granuloza hücrelerinde, teka ve intersitisyel hücrelerde saptandı. Kontrol grupları ve deney grubunda tüm folliküllerin oositlerinde TGF- β 1 ekspresyonu benzer olup, şiddetli immunreaksiyon gösterdi. Yapılan çalışmaya benzer olarak sıçan (41), fare (16), hamsterlerde (36) yapılan immunhistokimyasal çalışma-

larda da follikül sınıflarında farklılık olmaksızın, tüm folliküllerin oositlerinde TGF-β1 ekspresyonu gözlemlendi.

Araştırmalarda, TGF-β1'in tür, yaş ve doku tipine bağlı olarak ekspresyonunun değiştiği belirtilmektedir (14, 21). Yapılan in vitro çalışmalarda, erişkin olmayan sıçan folliküllerinden (9) ve hamster preantral folliküllerinden (37) elde edilen granuloza hücrelerinde, TGF-β1'in proliferasyonu arttırdığı, ineklerin büyük antral folliküllerinden elde edilen granuloza hücrelerinde (38) ise proliferasyonu inhibe ettiği belirtilmektedir. Bununla birlikte, insan ve farelerin preantral folliküllerinin granuloza ve teka hücrelerinde TGF-β1'in ekspresyonu olduğu (5, 6), bunun aksine ineklerin tüm folliküllerinde TGF-β1 ekspresyonuna rastlanmadığı bildirilmektedir (26). TGF-β1'in ayrıca sıçan, domuz ve hamsterlerin teka hücrelerinde ekspresyonu edildiği bildirilmektedir (20, 22).

Sunulan çalışmada kontrol grubu ovaryum dokularında gelişmekte olan folliküllerin (primordiyal, primer ve sekonder) granuloza hücrelerinde zayıf şiddette immunreaksiyon gözlenirken, gelişmiş folliküllerde immunreaksiyon gözlenmemiştir. Bunun aksine, çalışmada uygulanan düşük doz KAP'ın gelişmekte olan folliküllerin granuloza hücrelerinde TGF-β1 ekspresyonunu arttırdığı, gelişmiş folliküllerde ise orta şiddette TGF-β1 ekspresyonu sağladığı belirlendi. Yapılan çalışmaya benzer olarak, Nilsson ve ark. (26) folliküller geliştikçe TGF-β1 ekspresyonunun azaldığını gözlemişlerdir. Bunun aksine, insanlarda follikül gelişimine paralel olarak granuloza ve teka hücrelerinde TGF-β1 ekspresyonunun arttığı bildirilmektedir (8). Ayrıca, yapılan çalışmaya benzer olarak, insanlarda (5), hamster ve sıçan (20) ovaryumunun teka ve intersitisyel hücrelerinde TGF-β1 proteini tespit edilmiştir. Sunulan çalışmada, düşük doz kısa süreli KAP uygulamasının ovaryumda özellikle folliküllerin granuloza hücrelerinde, teka ve intersitisyel hücrelerde TGF-β1 ekspresyonunu arttırdığı gözlemlendi. Erdost ve ark. (10)' nın düşük doz KAP ile yaptığı bir diğer çalışmada, diyetlerine düşük dozda acı kırmızı biber ilave edilen tavuk ve horozların hipofiz bezinde FSH ve LH sentezinin ilk aylardan itibaren arttığını saptamışlardır. Araştırmacılar (10) bu hormonların hedef organları olan gonad gelişimini etkileyeceğini düşünmüşlerdir. Zık ve ark. (49) günlük diyetle kırmızı biberden alınacak miktara eş değer dozda KAP'ın, puber-

ta öncesi sıçanlarda ovaryum follikül atrezisini önlediğini, proliferasyon faktörü olan Ki 67 ekspresyonunu özellikle granuloza hücrelerinde kontrol grubuna göre yüksek seviyede olduğunu gözlemleyerek, ovaryum üzerinde düşük doz kısa süreli KAP'ın follikül gelişiminde etkili olduğunu belirtmişlerdir. Özer ve ark. (30) kanatlılarda yaptıkları bir çalışmada, kırmızı acı biber ile beslenen hayvanların ovaryumlarında folliküler gelişimin daha hızlı seyrederek deney grubu hayvanların yumurtlama dönemine 11 gün önce girdiklerini ve yumurta performanslarının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca in vitro yapılan bir çalışmada, düşük doz KAP'ın granuloza hücrelerinde proliferasyonu arttırdığı belirtilmektedir (13). Dolayısıyla sunulan çalışmada kısa süreli düşük doz KAP'ın ovaryum üzerinde yapmış olduğu etkilerde TGF-β1 protein yolağının rol oynayabileceği düşünülmektedir. KAP reseptörü olan VR1'in granuloza hücrelerinde varlığı düşünüldüğünde (43), KAP'ın VR1 aracılığıyla TGF-β1 yolağını aktive ederek ovaryum follikülogenezisini düzenlediği ileri sürülebilir. Ayrıca sıçan granuloza hücrelerinde TGF-β1 ve β2 varlığında FSH-R ve LH-R ekspresyonunun arttığı da gösterilmektedir (12). KAP'ın granuloza, teka ve intersitisyel hücrelerde TGF-β1 ekspresyonunu arttırması bu hücrelerde FSH-R ve LH-R ekspresyonunu da arttırabileceği ve dolaylı olarak östrojen üretiminde etkili olabileceği öngörülebilir. Bununla birlikte TGF-β1 seviyesinin hem polikistik over sendromlu (PCOS) dişi bireylerin serumlarında (34) hem de epitelyal over kanserli bireylerden alınan ovaryum dokularında (18) yüksek miktarda olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, sunulan çalışmada, düşük dozda KAP uygulanmasının, follikülogenezis aşamasında TGF-β1 ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir. KAP'ın ovaryum üzerine olası etkileri ile ilgili detaylı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç olduğu ileri sürülebilir.

Kaynaklar

1. Alatrıste V, Herrera-Camacho I, Martínez MI, Limon ID, Gonzalez-Flores O, Luna F. Sensory denervation with capsaicin reduces ovarian follicular development and delays the onset of puberty in guinea pigs. *Adv Reprod Sci* 2013; 1(3): 29-37.
2. Bondestam J, Huotari MA, Morén A, Ustinov J, Kaivo-Oja N, Kallio J, Horelli-Kuitunen N, Aaltonen J, Fujii M, Moustakas A, Ten Dijke

- P, Otonkoski T, Ritvos O. cDNA cloning, expression studies and chromosome mapping of human type I serine/threonine kinase receptor ALK7 (ACVR1C). *Cytogenet Cell Genet* 2001; 95(3-4): 157-62.
3. Calka J, McDonald JK, Ojeda SR. The innervation of the immature rat ovary by calcitonin gene-related peptide. *Biol Reprod* 1988; 39(5): 1215-23.
 4. Chang WY, Ohmura H, Kulp SK, Lin YC. Transforming growth factor β 1 regulates differentiation of porcine granulosa cells in vitro. *Theriogenology* 1993; 40(4): 699-712.
 5. Chegini N, Flanders KC. Presence of transforming growth factor-beta and their selective cellular localization in human ovarian tissue of various reproductive stages. *Endocrinology* 1992; 130(3): 1707-15.
 6. Christopher B. Immunolocalization of transforming growth factor-beta1 during follicular development and atresia in the mouse ovary. *Endocr J* 2000; 47(4): 475-80.
 7. Crossmonn G. A modification of mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *Anat Rec* 1937; 69 (1): 33-8.
 8. Derry S, Lloyd R, Moore RA, McQuay HJ. Topical capsaicin for chronic neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; CD007393.
 9. Dorrington J, Chuma AV, Bendell JJ. Transforming growth factor β and follicle-stimulating hormone promote rat granulosa cell proliferation. *Endocrinology* 1988; 123 (1): 353-9.
 10. Erdost H, Özer A, Yakışık M, Özfiliz N, Zık B. FSH and LH cells in the laying hens and cocks, fed with a diet containing red hot pepper. *J Food Agri Environ* 2006; 4(1): 119-23.
 11. Filipczak-Bryniarska I, Krzyzewski RM, Kucharz J, Michalowska-Kaczmarczyk A, Kleja J, Woron J, Strzepek K, Kazior L, Wordliczek J, Grodzicki T, Krzemieniecki K. High-dose 8% capsaicin patch in treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Single-center experience. *Med Oncol* 2017; 34(9): 162.
 12. Gitay-Goran H, Kim IC, Miggans ST, Schomberg DW. Transforming growth factor beta modulates gonadotropin receptor expression in porcine and rat granulosa cells differently. *Biol Reprod* 1993; 48(6): 1284-9.
 13. Güler S, Zık B. Effects of capsaicin on ovarian granulosa cell proliferation and apoptosis. *Cell Tissue Res* 2018; 372(3):603-9.
 14. Hu PP, Datto MB, Wang XF. Molecular mechanisms of transforming growth factor-beta signaling. *Endocr Rev* 1998; 19(3): 349-63.
 15. Jensen-Jaorlim E, Gajdzik L, Haberl I. Hot spices influence permeability of human intestinal epithelial monolayers. *J Nutr* 1998; 128(3): 577-81.
 16. Juneja SC, Chegini N, Williams RS, Ksander GA. Ovarian intra-bursal administration of transforming growth factor β 1 inhibits follicle rupture in gonadotropin-primed mice. *Biol Reprod* 1996; 55(6): 1444-51.
 17. Knight PG, Glister C. Local roles of TGF-superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Anim Reprod Sci* 2003; 78(3-4): 165-83.
 18. Kohan-Ivani K, Gabler F, Selman A, Vega M, Romero C. Role of dihydrotestosterone (DHT) on TGF- β 1 signaling pathway in epithelial ovarian cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2016; 142(1): 47-58.
 19. Kress M, Gutimann C, Averbeck B, Reeh PW. Calcitonin gene related peptid and prostaglandin E2 but not substance P release induced by antidromic nerve stimulation from rat skin in vitro. *Neuroscience* 1999; 89 (1): 303-10.
 20. Levacher C, Gautier C, Saez JM, Habert R. Immunohistochemical localization of transforming growth factor beta 1 and beta 2 in the fetal and neonatal rat ovary. *Differentiation* 1996; 61(1): 45-51.
 21. Lin HY, Wang XF, Ng-Eaton E, Weinberg RA, Lodish HF. Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* 1992; 68(4): 775-85.
 22. May JV, Stephenson LA, Turzcynski CJ, Fong HW, Mau YH, Davis JS. Transforming growth factor beta expression in the porcine ovary: evidence that theca cells are the major secretory source during antral follicle development. *Biol Reprod* 1996; 54(2): 485-96.
 23. Mondschein JS, Canning SF, Hammond JM. Effects of transforming growth factor β on the production of immunoreactive insulin-like growth factor I and progesterone and on [3H] thymidine incorporation in porcine gra-

- nulosa cell cultures. *Endocrinology* 1988; 123(4): 1970-6.
24. Moran C, Morales L, Razo SR, Apolonio J, Quiroz U, Chavira R, Dominguez R. Effect of sensorial denervation induced by capsaicin injection at birth or on day three of life, on puberty, induced ovulation and pregnancy. *Life Sci* 2003; 73(16): 2113-25.
 25. Nance DM, King TR, Nance PW. Neuroendocrine and behavioral effects of intrathecal capsaicin in adult female rats. *Brain Res Bull* 1987; 18(1): 109-14.
 26. Nilsson EE, Doraiswamy V, Skinner MK. Transforming growth factor-beta isoform expression during bovine ovarian antral follicle development. *Mol Reprod Dev* 2003; 66(3): 237-46.
 27. Ohtomo K, Ebihara N, Matsuda A, Tokura T, Funaki T, Murakami A. Role of TGF-β1 in tissue eosinophilia associated with vernal kerato-conjunctivitis. *Exp Eye Res* 2010; 91(5): 748-54.
 28. Oliveros L, Forneris M, Aguado L. Secretion from neuropeptidetreated splenocytes modifies ovarian steroidogenesis. *Medicina* 2001; 61(1): 35-40.
 29. Olson LM, Jones-Burton CM, Jablonka-Shariff A. Nitric oxide decreases estradiol synthesis of rats luteinized ovarian cells: possible role for nitric oxide in functional luteal regression. *Endocrinology* 1996; 137(8): 3531-9.
 30. Özer A, Erdost H, Zık B. Histological investigations on the effects of feeding a diet containing red hot pepper on the reproductive organs of the chicken. *Phytother Res* 2005; 19(6): 501-5.
 31. Özgüden Akkoc CG, Ozer A. Immunohistochemical localization of transforming growth factor β 1 and β 2 in mouse testes during postnatal development. *Biotech Histochem* 2011; 87(2): 154-9.
 32. Panossian A, Gabrielian E, Wagner H. Dose-dependent reversal effects of Capsaicin on interleukin-1α production is associated with the metabolism of arachidonic acid (leukotriene B(4) and prostaglandin E(2)) as well as nitric oxide production in human leukocytes. *Phytomedicine* 1996; 3(2): 169-74.
 33. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saade JI, West AB. Myofibroblasts, paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 1999; 277(1): 1-19.
 34. Raja-Khan N, Kunselman AR, Demers LM, Ewens KG, Spielman RS, Legros RS. A variant in the fibrillin-3 gene is associated with TGF-beta and inhibin B levels in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2010; 94(7): 2916-9.
 35. Roberts AJ, Skinner MK. Transforming growth factor-alpha and -beta differentially regulate growth and steroidogenesis of bovine thecal cells during antral follicle development. *Endocrinology* 1991; 129(4): 2041-8.
 36. Roy SK, Ogren C, Roy C, Lu B. Cell-type-specific localization of transforming growth factor-beta 2 and transforming growth factor-beta 1 in the hamster ovary: Differential regulation by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Biol Reprod* 1992; 46(4): 595-606.
 37. Siegel PM, Massagué J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(11): 807-21.
 38. Skinner MK, Keski-Oja J, Osteen KG, Moses HL. Ovarian thecal cells produce transforming growth factor-beta which can regulate granulosa cell growth. *Endocrinology* 1987; 121(2): 786-92.
 39. Smith MS, Freeman ME, Neill JD. The control of progesterone secretion during the cycle and early pseudopregnancy. *Endocrinology* 1975; 96(1): 219-26.
 40. Surh YJ, Lee SS. Capsaicin in hot chili pepper: Carcinogen, co-carcinogen or anticarcinogen? *Food Chem Toxicol* 1996; 34(3): 313-6.
 41. Teerds KJ, Dorrington JH. Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 during follicular development in the adult rat ovary. *Mol Cell Endocrinol* 1992; 84(1-2): 7-13.
 42. True LD. Atlas of Diagnostic Immunohistopathology. First Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1990; p.16-22.
 43. Tütüncü Ş, Özfiliz N. Distribution of the vanilloid (capsaicin) receptor type 1 in the capsaicin treated rat ovaries on different sexual development periods. *Rev Med Vet* 2011; 162(10): 460-7.
 44. Uzumcu M, Kuhn PE, Marano JE, Armenti AE, Passantino L. Early postnatal methoxychlor exposure inhibits folliculogenesis and stimulates anti-Müllerian hormone production in the rat ovary. *J Endocrinol* 2006;

- 191(3): 549-58.
45. Vaishnava P, Wang DH. Capsaicin sensitive sensory nerves and blood pressure regulation. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 2003; 1(2): 177-88.
 46. Wang F, Shi R, Zhao L. Expression and significance of TGF- β 1 and VEGF in formation of new blood vessels after rabbit corneal suture. *Recent Adv Ophthalmol* 2008; 28(2): 96-9.
 47. Yang W, Gong X, Zhao X, An W, Wang X, Wang M. Capsaicin induces apoptosis in HeLa cells via Bax/Bcl-2 and Caspase-3 Pathways. *Asian Pac J Trop Med* 2006; 1(3-4): 1-7.
 48. Yu SM, Lin KH. Morphological alterations in the trachea of capsaicin-pretreated rat during postnatal development. *Zool Stud* 2002; 41(1): 13-22.
 49. Zık B, Özgüden Akkoç C.G. Tütüncü S, İlhan T, Yılmaztepe AO, Özenci CC. Effects of low dose capsaicin (CAP) on ovarian follicle development in prepubertal rat. *Rev Med Vet* 2010; 161(6): 288-94.

Sorumlu Yazar:

Prof. Dr. Berrin ZIK
Uludağ Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Bursa-TÜRKİYE
Tel:0-224-2941265
E-posta:bzik@uludag.edu.tr



Determination of Some Antibiotic Residues by HPLC Method in Chicken Meats Prepared for Consumption***

Emre ARSLANBAŞ¹, Seyda ŞAHİN², Recep KALIN³, Mahmut Niyazi MOĞULKOÇ³, Hüseyin GÜNGÖR¹

¹Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, Sivas-TURKEY

²Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary Medicine, Food Hygiene and Technology Department, Sivas-TURKEY

³Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Sivas-TURKEY

Summary: In this study, it is aimed to search residues of enrofloxacin, doxycycline and tylosin which are widely used in poultry farming in fresh and packaged chicken meat samples taken from five brands being sold nationwide, through HPLC method. Enrofloxacin, doxycycline and tylosin levels in the samples of chicken meat were evaluated according to "The Regulation on Classification of Active Pharmacologic Substances that might be Available in Food of Animal Origin in Turkish Food Codex and Maximum Residue Limits" and international limits. Maximum residue limit (MRL) of enrofloxacin, doxycycline and tylosin in muscle tissues of chickens must be 100 µg/kg according to applicable regulations and international limits. It was found in totally 300 analyzed samples (whole chicken, drumstick and breast meat) that 11 (3.6%) of them had enrofloxacin, doxycycline and tylosin levels higher than MRL (between 100-150 µg/kg). Residue levels were less than allowed limits in other samples. Six (2%) of these 11 samples had enrofloxacin, 3 (1%) had doxycycline and 2 (0.6%) had tylosin residues. Since the results of this study showed that the majority of samples were lower than allowed limits, these results were considered as positive. However, as long as medicines do continue to be used for animals' health, there will always be a risk of existence of medicine residues in food of animal origin. Many stakeholders have a role in preventing residue risk arising out of veterinary medicines and all these persons must pay necessary attention to residue purification duration, training programs and keeping regular records of animals.

Key words: Chicken meat, doxycycline, enrofloxacin, residue, tylosin

Tüketime Sunulan Tavuk Etlerindeki Bazı Antibiyotik Kalıntılarının HPLC Yöntemi ile Belirlenmesi

Özet: Bu çalışmada, kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılan enrofloksasin, doksisisiklin ve tilosin kalıntılarının, satışa sunulan beş farklı ulusal firmaya ait paketlenmiş taze tavuk eti örneklerinde HPLC yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır. Tavuk eti örneklerindeki enrofloksasin, doksisisiklin ve tilosin düzeyleri, "Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği"ne ve uluslararası limitlere göre değerlendirilmiştir. İlgili yönetmelikte ve uluslararası limitlerde enrofloksasin, doksisisiklin ve tilosin için tavuk kas dokuda maksimum kalıntı limiti (MKL) 100 µg/kg olarak verilmiştir. Analizi yapılan toplam 300 örneğin (bütün tavuk, but eti ve göğüs eti) 11 (%3.6)'inde farklı örneklerde ve düzeyde MKL üzerinde (100-150 µg/kg arasında) enrofloksasin, doksisisiklin ve tilosin bulunmuştur. Diğer örneklerde ise izin verilen limitlerin altında belirlenmiştir. Antibiyotik kalıntısı tespit edilen 11 örneğin 6 (%2)'si enrofloksasin, 3 (%1)'ü doksisisiklin ve 2 (%0.6)'si tilosin olarak saptanmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçların, büyük oranda izin verilen limitlerin altında kalması olumlu bir sonuç olarak değerlendirilmiştir. Ancak, hayvan sağlığı için ilaç kullanımı söz konusu olduğu sürece, hayvansal gıdalarda ilaç kalıntılarının bulunması riski muhtemeldir. Veteriner ilaçlarından ileri gelebilecek kalıntı riskinin önlenmesinde pek çok paydaşın rolü bulunmaktadır ve tüm ilgililer ilaç kalıntı arınma süresi, eğitim programları, hayvan kayıtlarının düzenli tutulması gibi konularda gereken hassasiyeti göstermelidir.

Anahtar kelimeler: Doksisisiklin, enrofloksasin, kalıntı, tavuk eti, tilosin

Introduction

Antibacterial medicines are used in poultries for treatment and protection purposes as well as

increasing efficiency, and growth factors (10). However, since most of these antibiotics that have been used as growth factors and to accelerate development have caused quick reproduction of some resistant strains among some pathogenic bacteria types (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp.) in humans and animals, they are no longer being used. European Union (EU) has

Geliş Tarihi/Submission Date : 02.10.2017

Kabul Tarihi/Accepted Date : 25.04.2018

* This study was supported by the Scientific Research Project Fund of Cumhuriyet University under the project number V-016

** This study was presented as a oral presentation in the I. International Scientific and Vocational Studies Congress, October, 2017; Nevşehir-Turkey.

widely prohibited to use antibiotic originated growth factors in poultry farming in 1998, and 1999 and has prohibited the usage of all growth factor antibiotics in the feeds of poultries in 2006. Rules applied in EU are also effective in our country in accordance with harmonization with EU legislations (6,22).

Inappropriate, illegal, uncontrolled and insensible utilization of antibiotics in poultries causes residues in food of animal origin (23). Resistant bacteria populations increase and accumulate in various organs and tissues, particularly in liver and kidneys as a result of insensible and uncontrolled utilization of antibiotics. On the other hand, these antibiotics may penetrate animal products and cause intoxications from mild allergies to anaphylactic shocks, teratogenic, mutagenic and carcinogenic effects, reproduction disorders and adverse effects on digestion tract flora in humans that consume such products, based on the type and amount of antibiotics available in these products (1,6,13). Increase of multi-resistant features of pathogenic microorganisms in antibiotics and utilization of similar antibiotic groups in treatment of humans and animals has led us to think that the number of antibiotics that can be used in treatment of humans will be significantly decreased in the future. The effectiveness of antibiotic, which causes the occurrence of resistant bacteria, will also decrease and, thus, the medicine consumption will increase (6,20). Antibiotic residues penetrating humans kill non-resistant and harmless bacteria in the body and cause the reproduction of strong and harmful bacteria, which also renders antibiotics ineffective. These residues also prevent reproduction of starter cultures in food industry, particularly in the production of yogurt, cheese and sausage, which, in turn, causes the occurrence of production faults and economic losses (12). Medicine residues in foods that are exceeding tolerated levels cause various threats to the human health and such food must not be consumed. Tolerance levels show allowable levels of medicine residues in raw tissues according to applicable legislations. However, most of the food of animal origin, such as meat, milk and egg, are consumed after they are cooked through different methods, and such different cooking methods cause differences in the solubility or quantities of medicine residues (2,18).

Tetracycline group antibiotics (doxycycline),

which are widely used for poultries since they are broad spectrum antibiotics with low toxic effects, broad spectrum fluoroquinolones (enrofloxacin) and narrow effect spectrum macrolides (tylosin) are the antibiotics that are used widely in poultry farming (4,6,16). Therefore, detection of enrofloxacin, doxycycline, and tylosin residues in chicken meats is highly important for the protection of the health of those who are the end consumers of these chicken meats. Possible antibiotics residue levels in the food of animal origin must be determined through highly selective and sensitive chemical methods. Today various advanced analytic methods capable of quantitative measurement, such as ELISA, Charm II, GC and HPLC, LC-MS and LC-MS-MS are used to detect antibiotic residues in different foodstuff and meats (14,23). High performance liquid chromatography (HPLC) is preferred not only because of its capability to analyze thermolabile compounds, but also because it is a specific, certain and sensitive method (19).

Enrofloxacin, doxycycline and tylosin are widely used antibiotics in poultry farming. Insensible and uncontrolled utilization of antibiotics causes resistant bacteria population to increase, their residues penetrate animal products and cause intoxications and undesired effects, ranging from mild allergies to anaphylactic shocks on humans that consume these products. HPLC is the preferred method in calculating the levels of antibiotic residues in food of animal origin since it is a specific, certain and sensitive method. Therefore, detection of enrofloxacin, doxycycline, and tylosin residues in chicken meats by HPLC method is highly important for protection of public health.

Material and Methods

300 packaged fresh chicken meat samples, 100 of which were whole chicken, 100 were drumstick and the last 100 were chicken breast, taken from five different brands being sold nationwide for consumption, were used in this study. These samples were quickly brought to the laboratory without breaking the cold chain (at +4°C). Samples were analyzed by HPLC method in order to detect enrofloxacin, doxycycline and tylosin residues. The chemicals used in the study were enrofloxacin (33699, HPLC reagent), doxycycline (33429, HPLC reagent) and tylosin (32298, HPLC reagent) standards, methanol, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, USA), for-

mic acid (Scharlau; Barcelona, Spain) and acetonitrile (Merck; Darmstadt, Germany) (All chemicals used in the study were used as HPLC grade). 0.1 mg/ml stock standard solutions of enrofloxacin and doxycycline standards were prepared in methanol and tylosin standard was prepared in acetonitrile.

The method suggested by Chico et al. (8) was used for analysis after it was modified and adapted for laboratory conditions. When preparing the samples, initially muscle tissues that were separated from fat and skin tissues were cut into small pieces. Then these pieces were minced and 3 g of each were put into polypropylene centrifuged tubes of 50 ml before adding 200 µl 0.1 M EDTA and 10 ml methanol: ultra distilled water (70:30, v/v) mixture. The mixture was mixed for 30 seconds with vortex and mechanically for 15 minutes and then centrifuged at 2507×g for 5 minutes. 500 µl of extract was diluted with 2 ml ultra distilled water and this dilution was passed through 0.45 µm membrane filter (Sartorius; Göttingen, Germany). Finally 20 µl of filtrate was applied to HPLC system.

phase, composed of acetonitrile and 0.1% formic acid. Study standards, diluted at different concentrations of 5, 10, 20, 50 and 100 µg/kg from standard stock solution, were prepared for calibration graphic. These solutions that were prepared in different concentrations were studied in 3 separate times to form calibration graphics and their LOD (limit of detection) and LOQ (limit of quantification) values were calculated. Recovery rates were calculated by adding the standard solutions in 3 different concentrations to the samples, antibiotic content of which is known. Regression analysis was performed with NCFE statistic software.

Results

Standard calibration formula, found for enrofloxacin, doxycycline, and tylosin are given in Table 1 with their R² (R-squares) and recovery rates as well as LOD and LOQ values. The results showed that the highest R² rate is seen in tylosin with a value of 0.99 and the highest recovery rate is seen in enrofloxacin with a rate of 100.14% (doxycycline and tylosin recoveries respectively; 99.03%, 100.78%). The lowest

Table 1. Standard calibration formula, R² and recovery rates and LOD and LOQ values of antibiotics

Antibiotics	Standard calibration formula (y=ax+b)			Recovery rate (%)	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
	a	b	R ²			
Enrofloxacin	9840.2	252071	0.89	100.14	0.426	1.292
Doxycycline	3466.5	108675	0.97	99.03	1.469	4.450
Tylosin	15238	94842	0.99	100.78	0.364	1.104

Analyses were performed in HPLC device (Flexar HPLC-Perkin Elmer; Massachusetts, USA) by using photodiode array detector and UV detector. Bio C₁₈ (5 µm, 150 mmx4.6 mm) was used as column (Brownlee Bio C₁₈; Shelton, USA). The data received from the device were processed with Chromera software. The study was performed isocratic by using mobile

LOQ value of 1.104 µg/kg was found in tylosin (enrofloxacin LOQ value 1.292 µg/kg; doxycycline LOQ value 4.450 µg/kg).

Results of analyses were evaluated according to "The Regulation on Classification of Active Pharmacologic Substances that might be Available in Food of Animal Origin in Turkish Food

Table 2. Antibiotic residue amounts in chicken meat samples

Sample	Enrofloxacin [µg/kg]	Doxycycline [µg/kg]	Tylosin [µg/kg]	Total
Drumstick	2 [111.9; 115.5]	1 [121.4]	1 [105.4]	4 (1.3%)
Breast	3 [124.3; 129.7; 144.1]	1 [137.6]	1 [109.2]	5 (1.6%)
Carcasses	1 [130.2]	1 [126.8]	-	2 (0.6%)
Total	6 (2%)	3 (1%)	2 (0.6%)	11 (3.6%)

Codex and Maximum Residue Limits” (21) and international (EU 37/2010 EC directives) (9) limits. Aforesaid regulation and international limits require maximum amount of enrofloxacin, doxycycline, and tylosin must be MRL 100 µg/kg in chicken’s muscle tissue. The amount of enrofloxacin, doxycycline, and tylosin found in 11 (3.6%) of total 300 analyzed samples, taken as whole chicken, drumstick and breast, was higher than MRL (between 100-150 µg/kg). Residue levels were less than allowed limits in other samples. 6 (2%) of these 11 samples had enrofloxacin, 3 (1%) had doxycycline, and 2 (0.6%) had tylosin residues. More than allowed amounts of antibiotics were found in 5 (1.6%) chicken breast meat, 4 (1.3%) drumstick and 2 (0.6%) whole chicken meat, which were among analyzed samples (Table 2).

Discussion and Conclusion

When the results achieved from this study were evaluated according to “The Regulation on Classification of Active Pharmacologic Substances that might be Available in Food of Animal Origin in Turkish Food Codex and Maximum Residue Limits” (21) and international (EU 37/2010 EC directives) (9) limits, it was found that enrofloxacin, doxycycline, and tylosin levels (100-150 µg/kg) were over the allowed limits (MRL should be 100 µg/kg in chicken muscle tissue for enrofloxacin, doxycycline and tylosin) in only 11 (3.6%) of 300 analyzed samples in total. Antibiotic levels of other samples were found less than MRL (100 µg/kg in chicken muscle tissue for enrofloxacin, doxycycline and tylosin).

As the results were mostly lower than allowed limits, the results of this study were found in compliance with the results of some previous studies (3,5,11,14). In a study, fluoroquinolone group antibiotic (ciprofloxacin, enrofloxacin, balofloxacin) residues in broiler meats in Argentina were found to be less than MRL (11). Bousova et al. (5) analyzed 36 different antibiotics, such as enrofloxacin, tylosin, doxycycline, chlortetracycline, ciprofloxacin, danofloxacin, josamycin, kanamycin, lincomycin, neomycin, oxytetracycline, spiramycine, and tilmicosin, in samples of chicken meat and it was found as a result of this study that antibiotics are less than maximum residue limits. In another study conducted by Lopes et al. (14) the residue analysis of 20 veterinary medicines, including quinolones, sulphonamides, macrolides, anthelmintics,

avermectins, diamino derivatives, and benzathine penicilines, was performed in 11 samples of chicken meat taken from local supermarkets in Spain (Almeria), and it was found that results were lower than MRL. Also the data retrieved from erythromycin, tylosin, spiramycine, josamycin, roxycytrhomycin, troleandomycine and tilmicosin analyses on beef, chicken and pig meats as well as seabream and trout meats, taken from various supermarkets in Spain, were found to be lower than MRL (3).

On the other hand, in a study performed on 98 poultry samples (61 chicken meat and 37 turkey meat) in Portugal to research fluoroquinolone group antibiotics (enrofloxacin, ciprofloxacin, norfloxacin, and sarafloxacin) it was found that 44.2% of chicken meat and 37.8% of turkey meat was contaminated with antibiotics (16). In another study, 270 samples (chicken muscle, liver and kidneys) taken from a Tehran slaughterhouse in Iran, were analyzed for residues of enrofloxacin through HPLC method and the residues in 8 muscle, 12 liver and 22 kidney samples were found to be higher than MRL (17).

Regarding the studies in Turkey, Akar (1) researched erythromycin, chloramphenicol, monencyn and tylosin residues on 175 chicken meat samples, taken from markets and companies operating in Ankara market. As a result of the study, erythromycin residues were found in 2.3% and tylosin residues were found in 1.14% of the samples and it was stated that 5.7% of chicken meats contain 3 of 4 antibiotics (except monencyn) in different levels. In another study, Yıldırım et al. (24) examined 40 chicken meat samples being sold in Istanbul in order to investigate enrofloxacin and danofloxacin residues, which are fluoroquinolone derivatives, and the results showed that there was not any enrofloxacin and danofloxacin residues within 50 µg/kg. Öbekçi (15) has researched tetracycline group antibiotics (tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline) residues in 200 chicken meat samples through HPLC method. The results showed that there were 8.1% oxytetracycline, 7% tetracycline, and 5.5% chlortetracycline residues in the samples. Another study was performed in 2012 on 60 chicken meat samples, taken from supermarkets in Bursa, by analyzing tetracycline group antibiotics with liquid chromatography-double mass spectrometer and doxycycline was found in 4 and tetracycline was

found in 1 of the samples. No oxytetracycline and chlortetracycline was found in any of the samples (7). It is seen that the results of this study are similar, in terms of MRL, to the results of the studies, performed by Yıldırım et al. (24) and Cetinkaya et al. (7).

As the results of this study, in which enrofloxacin, doxycycline, and tylosin residues were researched in chicken meats, were mostly lower than allowed limits, they were considered as positive results for risk evaluation. However, as long as medicines continue to be used for animals' health, there will always be a risk of existence of medicine residues in food of animal origin and penetration of this residues to consumers at different levels. But the most important issue at this point is to have residue levels under the tolerance limits.

In conclusion, the stakeholders, namely the veterinary physician who issues the prescription or makes the treatment, the farmer or keeper of animals, and other organizations, have a role in preventing of veterinary medicine residues in food of animal origin. It is also highly important to keep regular records of animals and monitor medicine consumption. It might be useful to inform and give training to farmers and their employees, which aim proper and timely utilization of veterinary medicines in order to prevent residues by taking social and economic status of farmers and practices on the field into consideration. Manufacturers must comply with medicine residue purification duration, take preventive actions to protect farming equipment from contamination, and differentiate the animals, which have received medicines, from others either by marking them individually or through group records. So it might be possible to be protected from residues, which are important for public health, and to reduce economic risks.

References

1. Akar F. Investigation on various antibiotic residues in chicken meat and liver. *AÜ Vet Fak Derg* 1994; 41(2): 199-207.
2. Baydan E, Filazi A, Kum C, Sekkin S. Etlik piliçlerde pişirme ve dondurma işlemlerinin ilaç kalıntıları üzerine etkileri: 1. enrofloksasin üzerine pişirme ve farklı sürelerde soğukta depolamanın etkisi. *Türk Vet Hek Derg* 2000; 71: 19-22.
3. Berrada H, Borrull F, Font G, Marcé RM. Determination of macrolide antibiotics in meat and fish using pressurized liquid extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2008; 1208 (2008): 83-9.
4. Berrada H, Moltó JC, Mañes J, Font G. Determination of aminoglycoside and macrolide antibiotics in meat by pressurized liquid extraction and LC-ESI-MS. *J Sep Sci* 2010; 33(4-5): 522-9.
5. Bousova K, Senyuva H, Mittendorf K. Quantitative multi-residue method for determination antibiotics in chicken meat using turbulent flow chromatography coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2013; 1274: 19-27.
6. Can HY, Çelik TH. The residue risk and use of antibiotic in poultry breeding. *Vet Hekim Der Derg* 2008; 79(4): 35-40.
7. Cetinkaya F, Yibar A, Soyutemiz GE, Okutan B, Ozcan A, Karaca MY. Determination of tetracycline residues in chicken meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Addit Contam Part B* 2012; 5 (1): 45-9.
8. Chico J, Rubies A, Centrich F, Companyo R, Prat MD, Granados M. High-throughput multiclass method for antibiotic residue analysis by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2008; 1213(2008): 189-99.
9. Commission Regulation. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf. Erişim tarihi:02.10.2017.
10. Filazi A. Kanatlılarda akılcı antibakteriyel ilaç kullanımı. *Mektup Ankara* 2009; 7(2): 3-8.
11. Garcia-Ovando H, Gorla N, Weyers A, Ugnia L, Magnoli A. Simultaneous quantification of ciprofloxacin, enrofloxacin and balofloxacin in broiler chicken muscle. *Arch Med Vet* 2004; 36(1): 93-8.
12. Kaya S, Şahal M. Drug residues in foodstuffs, their tolerance levels and withdrawal times for slaughtering animals or discarded times of milk from animals given drugs. *AÜ Vet Fak Derg* 1989; 36(2): 390-403.
13. Lee JB, Chung HH, Chung YH, Lee KG. Development of an analytical protocol for detecting antibiotic residues in various fo-

- ods. Food Chem 2007; 105: 1726-31.
14. Lopes RP, Reyes RC, Romero-González R, Frenich AG, Vidal JLM. Development and validation of a multiclass method for the determination of veterinary drug residues in chicken by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Talanta 2012; 89: 201-8.
15. Öbekçi J. Tavuk eti ve karaciğerlerinde tetrasiklin grubu antibiyotiklerin HPLC ile saptanması. Uzmanlık Tezi. Tarım ve Köyüşleri Bakanlığı. 2002.
16. Pena A, Silva LJG, Pereira A, Meisel L, Lino CM. Determination of fluoroquinolone residues in poultry muscle in Portugal. Anal Bioanal Chem 2010; 397(6): 2615-21.
17. Salehzadeh F, Salehzadeh A, Rokni N, Madani R, Golchinfar F. Enrofloxacin residue in chicken tissues from Tehran slaughterhouses in Iran. Pakistan J Nutrition 2007; 6(4): 409-13.
18. Sever E, Baydan E. The effect of various cooking and freezing processes on the levamisole residues in broiler tissues. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2013; 19(2): 239-44.
19. Sırmagül B. Terapötik ilaç düzeyi izleminde analiz yöntemleri ve çalışma ilkeleri. Türk Farmakoloji Derneği XVII. Farmakoloji Eğitim Sempozyumu. 28 Mayıs 2010. Lefkoşa-Kıbrıs.
20. Tang HP, Ho C, Lai SS. High-throughput screening for multi-class veterinary drug residues in animal muscle using liquid chromatography/tandem mass spectrometry with on-line solid-phase extraction. Rapid Commun Mass Spectrom 2006; 20(17): 2565-72.
21. The Official Gazette of the Republic of Turkey. The regulation on classification of active pharmacologic substances that might be available in food of animal origin in Turkish food codex and maximum residue limits, T.C. Başbakanlık, Mevzuatı Geliştirme ve Yayın Genel Müdürlüğü Mevzuat Bilgi Sistemi, 04.05.2012, <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2012/05/20120504-9.htm>, Erişim tarihi: 11.10.2017.
22. Tuncer Hİ. To banned usage of hormones, antibiotics, anticoccidials and drugs in compound animal feed. Lalahan Hay Arast Enst Derg 2007; 47(1): 29-37.
23. Yıbar A, Soyutemiz GE. Antibiotics use in food-producing animals and possible residual risk. Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg 2013; 8(1): 97-104.
24. Yıldırım M, Demirel H, Bakirel T. The investigations on the residues of the some fluoroquinolone antibacterials in chicken meat marketed in Istanbul. İstanbul Üniv Vet Fak Derg 1996; 22(1): 63-7.

Corresponding Author:

Asst Prof Emre ARSLANBAŞ
Cumhuriyet University,
Faculty of Veterinary Medicine,
Department of Pharmacology and Toxicology,
Sivas-TÜRKİYE
E-mail: earslanbas@cumhuriyet.edu.tr



Balık Tüberkülozunda Tedavi

Bülent BAŞ¹, Hidayet TÜTÜN², Levent ALTINTAŞ³

¹Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Ankara-TÜRKİYE

²Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı,
Burdur-TÜRKİYE

³Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı,
Ankara-TÜRKİYE

Özet: Balık tüberkülozu; dünyada birçok balığı etkileyen, kronik seyirli, bulaşıcı ve zoonotik bir hastalıktır. Hastalık, tatlı ve tuzlu sularda yaşayan birçok balık türünü etkilemekle birlikte, özellikle tropikal akvaryum balıklarında daha sık görülür. Son yıllarda, hastalık insidansındaki artışa paralel olarak, su ürünleri sektöründe neden olduğu ekonomik kayıplar yönüyle de hastalık önemini korur. Ayrıca hastalık; zoonotik karakterde olması nedeniyle, halk sağlığı açısından da önem arz eder. Özellikle balıkçılar, veteriner hekimler, balık yetiştiricileri, pet shop sahipleri gibi bazı meslek sahipleri için tehlikelidir. Balık tüberkülozunda sağaltım oldukça güç, pahalı ve uzun zaman gerektirir. Bu nedenle genellikle hastalıklı olan hayvanların imhası ilk tercihtir.

Anahtar kelimeler: Balık, tedavi, tüberküloz

Treatment in Fish Tuberculosis

Summary: Fish tuberculosis is a chronic, infectious and zoonotic disease that affects many fish in the world. The disease affects many fish species living in sweet and salty waters. But, it is more common in tropical aquarium fish. Recently, in parallel with the increase in the incidence of disease, the disease has been important in terms of economic losses in the aquaculture sector. In addition, because of its zoonotic character, it is also important for public health. It is dangerous for some professionals like fishermen, veterinarians, fish farmers and pet shop owners. Treatment of fish tuberculosis is very difficult, expensive and takes a long time. For this reason, the destruction of infected animals is the first choice.

Key words: Fish, treatment, tuberculosis

Giriş

Mycobacteriaceae familyasına bağlı Mycobacterium generi içinde, alt türlerle birlikte 130'dan fazla tür bulunur. Bu bakteriler, hareketsiz, sporuz, aerobik, asido-rezistans, hafif kıvrık, düzgün çomak veya kokoid şeklinde 0.2-0.6x1.0-10µm boyutundadırlar. Yavaş üremeleri, aside dirençli olmaları ve hücre duvarlarında bol miktarda lipid bileşiği içermeleri bu bakterilerin temel özelliklerindedir (6,8,25). Balıklarda tüberküloza neden olan etken türleri de bu familya içerisinde yer alırlar.

Hazırlanan bu derlemede; balık tüberkülozu hakkında kısa bir bilgi verilerek, hastalıkla mücadelede yapılması gerekenler özet olarak sunulmaya çalışılmıştır.

Etiyoloji

Balık tüberkülozu (fish tuberculosis, piscine tuberculosis); çeşitli balık türlerinde (tatlı ve tuzlu

sularda yaşayan) organ ve dokularda değişik büyüklükte tüberküllerin oluşması ile karakterize, kronik ve genellikle de sporadik özellikle seyreden bulaşıcı bir enfeksiyondur (4,7). Hastalık, akvaryum balıklarında; hemen hemen tüm türlerde görülebilen, deri ve kas dokusunun yarılanması ve aşırı zayıflama ile karakterizedir (4).

Balıklar için en patojen Mycobacterium türü, *M. marinum*'dur. Bununla birlikte *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. smegmatis*, *M. abscessus*, *M. neonarum*, *M. simiae*, *M. scrofulaceum*, *M. poriferae* da balıklardaki önemli patojenler arasında yer alır (21,27,28,30).

Epizootiyoloji

Kontaminasyon; balıklara mikobakterilerle bulaşık gıdaların verilmesi, mikropla bulaşık akuatik artıkların yenmesi, deri ve/veya solungaçlardaki lezyonlardan etkenlerin içeri girmesi ile şekillenir (4,14,19). Hasta balıkların vücudunda oluşan lezyonlardan etkenler dışarı çıkarak, çevreyi ve suyu kontamine edebilir. Bu sebeple özellikle

balıkların kalabalık olduğu havuzlarda, bulaşma ve infeksiyon riski çok daha fazladır. Hastalıklı ve ölü balıkların etkeni ve dolayısıyla hastalığı yaymada önemli rolleri vardır. Bu sebeple, kalabalık yetiştirme yapılan ve su kalitesi iyi olmayan ortamlarda hastalığa daha sık rastlanır (4,8).

Bütün balık türleri genellikle hastalığa duyarlı olarak kabul edilirler; ancak, tropikal akvaryum balıkları hastalığa daha duyarlıdır (10,18,19,29). Bunun sebebinin de, bu balıkların uzun süre tutsak gibi yaşamlarına bağlı olarak gelişen "stres" kaynaklı olduğu bildirilmektedir. Balıklardan izole edilen etkenlerin büyük bir bölümünü *Mycobacterium marinum* oluşturur ve genellikle deniz balıklarında daha yaygın görülür. Tatlı su balıklarında ise *M. fortuitum* daha yaygın görülür (19). Tatlı su balık ailelerinden özellikle *Anabantidae*, *Characidae* ve *Cyprinidae* aileleri infeksiyona daha duyarlıdır (14). Hastalığın oluşmasında stres, ısı değişiklikleri, immun sistemin baskılanması ve tek yönlü besleme de önemlidir (1,3,18). Hastalık balıklarda, uzun süre asemptomatik olarak kalır (27). İnkubasyon periyodu 3 hafta ile 9 ay arasında değişir (14).

Klinik Belirtiler

Yoğun miktarda etkenle karşı karşıya kalan balıklarda, 4-8 hafta içerisinde iç organlarda granülomlar şekillenir (5). İlerleyen olgularda klinik semptom olarak; balıklarda ilerleyen bir zayıflama, iştahsızlık, durgunluk, durgunluğa bağlı olarak balıkların elle kolaylıkla yakalanabilmesi, nefes darlığı, diskolorasyon (renklerinde bozulma), pulların dökülmesi, deri ve yüzgeçlerde ülserler, tek veya çift taraflı ekzoftalmus (veya bazen ileri olgularda gözler içeri doğru da geçebilir), vertebra ve mandibulada deformasyonlar, spinal deformasyon, hareket yavaşlığı, yüzme bozuklukları görülür (10,18,29,32). Bu belirtileri vücut kas sisteminde dikkat çeken hemorajik lezyonların oluşması takip eder (27). Özellikle akvaryumda bulunan ve uzun süre hasta olan hayvanlarda iskelet deformasyonları da şekillenir (19). Ancak bu semptomların hepsini tek bir balıkta görebilmek mümkün değildir (4); hatta soğuk suda yaşayan alabalıklarda bazı durumlarda ölümden başka herhangi bir dış belirti de görülmeyebilir (19).

Zoonotik Önemi

İnsan sağlığı ve sıcakkanlı hayvanlar için, *M. marinum*, *M. fortuitum* ve *M. chelonae* önemlidir. Çünkü insanlarda el, yüz ve ayaklarda kutan

granülomalara neden olabilir. Özellikle *M. marinum* insanların ekstremitelerindeki deri granülomlarının en önemli sebebidir. İnfekte sularla yüzen insanlarda salgın halinde deride granülatöz oluşumlar görülebilir. İnsanlar arasında hastalığın bulaşması görülmez. *M. marinum* infeksiyonları; balıkçılar, veteriner hekimler, balık yetiştiricileri, pet shop sahipleri gibi bazı meslek sahipleri için özellikle tehlikelidir. *M. marinum*, *M. fortuitum* ve *M. chelonae* immun sistemi baskılanmış kişilerde insan patojeni olarak da bilinirler ve immun sistemi baskılanmış insanlarda (örneğin AIDS hastalarında) sistemik infeksiyonlara, hatta ilerleyen olgularda ölüme bile sebep olabilirler (8,9).

Sağaltım

Balık tüberkülozunda sağaltım oldukça güç, pahalı ve uzun zaman gerektirir. Bu nedenle genellikle hastalıklı olan hayvanların imhası ilk tercihtir. Frerichs ve Roberts (17) hastalıktan etkilenmiş olan balıkların tedavilerinin uygun olmayacağını ve hastalığa yakalanmış olan balıkların imha edilmesini ve bu işlemi takiben de hayvanların tutulduğu yerlerin de iyice dezenfekte edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir (4,17,18,19). Buna benzer şekilde Van Duijn (31) de, ticari olarak yetiştirilen balıkların tedavisinin yapılmaması gerektiğini; fakat, sağaltımın gerekli olduğu değerli ekzotik deniz türlerinin tedavisinde, rifampisin ve isoniazid kullanımını tavsiye etmiştir. Yine tedavi gerektiği durumlarda, parenteral yolla doksisisiklin veya minosiklin ile beraber sülfisoksazol kullanılmasını ve buna ek olarak da balıkların sularına tetrasiklin katılmasını önermiştir. Aynı araştırmacı kapalı alanlarda yetiştirilen balıklar için 24 saat süresinde litreye 10 mg kloramin B veya T eklenerek hastalığın kontrol altında tutulabileceğini, bu işlemden sonra da suyun tamamının değiştirilmesi gerektiğini ifade etmiştir (14,19,31).

Aslında balık tüberkülozuna karşı FDA tarafından onaylı etkili bir ürün ve tedavi yöntemi yoktur. Hastalığın bulunduğu ortamdaki mikobakteri pozitif balıklar, kendilerini pek belli etmezler. Bu balıklar kronik sağlık problemlerine, zayıf büyümeye ve düşük yemden yararlanma oranına sahiptirler. Eğer mikobakteriden şüpheleniliyorsa, kesin tanı kültür ve/veya moleküler teknikler ile konulmalı ve mutlaka tür tayini yapılmalıdır. Enfekte olmuş sistem popülasyondan alınmalı ve tüm ekipmanlar lysol veya konsantre etil alkol (%50-70) gibi mikobakterisidal ajanlar ile iyice dezenfekte edilmelidir (4,16,18,19). *M.*

marinum dezenfektanlara nispeten daha dirençlidir ve çoğu dezenfektanın etkili olabilmesi için daha uzun temas süresine ihtiyaç vardır. Bu türde %5 fenol, %1 sodyum hipoklorit, iodin solüsyonları (yüksek konsantrasyonda) gluteraldehit ve formaldehit daha etkilidir. Dezenfeksiyon için kullanılan kuarternler amonyum bileşiklerine karşı mikobakteriler direnç gösterirler. Mikobakterileri öldürmede, 10000 ppm kloririn yeterli olduğu; ayrıca, etkenin %65-80'lik alkollere de duyarlı olduğu bildirilmiştir (15).

Hastalıkla mücadelede kanamisin + isoniazid karışımı da tercih edilebilir. Bu seçenekte kanamisin tozları her 76 litreye 1/4 çay kaşığı olacak miktarda ve isoniazid de her 38 litreye bir tablet olacak miktarda kullanılır. Bu tedavide her 3 günde bir su değişikliği (en az %25) yapılması gerekir ve değiştirilen su ile atılan antibiyotik, mutlaka geri yerine konulmalıdır. İlaç uygulaması bu sistem ile 20-50 gün devam ettirilmelidir (2).

Akvaryum balıklarında tedavi amacıyla isoniazid, rifadin, rimactane (rifampin), streptomisin, klaritromisin, tetrasiklinler veya kanamisin kullanılabilir (4,14).

İsoniazid + kanamisin + vitamin B6 karışımının 30 gün boyunca kullanılması en etkili tedavi olarak değerlendirilir. Her 5 galon akvaryum suyuna 1 damla Vitamin B6 katılması önemlidir. Rifampisin, streptomisin ve eritromisin mikobakteri türlerine karşı etkili olmasına rağmen (20); akvaryum balıklarında, balık tüberkülozuna karşı kullanılan ethambutol, isoniazid ve/veya rifampisin ile elde edilen başarı oranı düşüktür (12). Antibiyotiklere karşı gelişen direnç tedavi için en büyük engeldir. Yapılan bir çalışmada, hastalık etkeninde streptomisin, rifampisin ve ethambutol'e karşı bakteriyel direnç geliştiği bildirilmiştir (11).

Tedavide diğer bir seçenek olarak; parenteral yolla doksisisiklin veya minosiklin ile beraber sülfisoksazol kullanılması, buna ek olarak balıkların sularına tetrasiklin katılması da önerilir (19). Kapalı alanlarda yetiştirilen balıklar için 24 saat süresinde litreye 10 mg kloramin B veya T eklenerek hastalığın kontrol altında tutulabileceği, bu işlemden sonra suyun tamamının değiştirilmesinin uygun olacağı bildirilmiştir (14).

Yüzeysel hastalığın aksine tendosynovitis ve artritisi kapsayan daha derin infeksiyonlarda ise genellikle antibiyotik tedavisinin yanı sıra cerrahi müdahale de gereklidir (13).

Süs balıklarında görülen mikobakteri enfeksiyonları ise "tedavi edilemez" olarak düşünülme-

lidir. Konu ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda akvaryum balıklarında antibiyotik sağaltımının olduğu öne sürülmesine rağmen, bireysel olarak hiçbir balığın bu hastalıktan tam olarak kurtulduğu bildirilmemiştir. Hastalığa ilişkin semptomların antibakteriyel ajan kullanımı ile hafiflediği, hatta tamamen ortadan kalktığı; ancak, antibiyotik uygulaması kesilince, belirtilerin yeniden başladığı bildirilmiştir (16).

Antibakteriyel ilaçlar ile tedavi şansı çok düşük olan balık tüberkülozundan korunmada ve eradikasyonda en önemli yöntem; dezenfeksiyon'dur. Enfekte olan her türlü akvaryum ekipmanlarının iyi dezenfeksiyonu mutlaka gereklidir. Etanol, benzil-4-klorofenol-fenil-fenol (lysol), ve sodyum klorit su içerisinde *M. marinum*'ları hızlı bir şekilde öldürmesine rağmen, N-alkil dimetil benzil amonyum klorid (roccal-D plus, micronex) ve potasyum peroksimonosülfat (virkon-S) etkene karşı etkisiz kalır (22).

Bir popülasyonda bulunan tüberkülozlu balıklar, enfeksiyonun diğer balıklara ve hatta insanlara bulaşmasında en önemli sorumlu faktörler arasındadır. Bu sebeple enfekte balık ve ekipmanlara temas eden insanlara karşı da oluşabilecek riski minimize etmek için mutlaka gerekli önleyici protokoller oluşturulmalıdır. Bu gibi durumlar büyük olasılıkla pet balıklarının sahipleri ile aralarındaki duygusal ilişkiden de kaynaklanır. Sürüdeki hastalıklı hayvanları herhangi bir izleme metodunun olmaması, hastalığın etkilerini minimize etmek için gerekli adımların atılmasını da zorunlu kılar. Hiçbir hayvan bulunduğu gruptan diğer bir gruba kontrolsüz ve gelişigüzel aktarılmalıdır. Yeni gelen bir balık gerekli kontroller yapılmadan popülasyona dâhil edilmemelidir. Dezenfeksiyona dikkat edilmesi ile birlikte; hastalık oluşumuna karşı alınabilecek en iyi önlemlerden bir diğeri de, optimal su kalitesinin sağlanmasıdır. Balıkların yaşam koşullarının en iyi hale getirilmesi için çevre koşulları düzenlenmelidir. Semptom gösteren balıklar alınmalı ve kullanılan ekipmanlar dezenfekte (UV filtreler ve/veya ozon) edilmelidir. Yetiştirme sistemindeki çakıl ve filtreler belli aralıklarla atılmalı veya yer değiştirilmelidir. Eğer izleme gerekiyorsa periyodik ötenazi yapılarak, hastalık testleri yapılması gerekir (16).

Hastalığın insanlarda görüldüğü durumlarda ise sağaltımın süresi infeksiyonun şiddetine, yapmış olduğu bozukluklara ve klinik yanıt gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak, 2 haftadan 18 aya kadar değişir. Tedavi için aşağıdaki ilaçlar ve kullanım yolları tercih edilebilir (14).

- Yetişkinlerde oral yolla günde 600 mg rifampin;
- Yetişkinlerde oral yolla günde 2 defa 100 mg minosiklin;
- 10-14 gün boyunca oral yolla 12 saat arayla trimetoprim-sulfametoksazol kombinasyonu (160 mg trimetoprim / 800 mg sulfametoksazol);
- Ethambutol günde 4 defa 25 mg/kg oral yolla; 1 ay süresince siprofloksasin, ethambutol ve klaritromisin kullanılabilir (13,26). Hastalığa karşı korunmada; *M. marinum*'a karşı *Mycobacterium* spp. Antijen 85A (Ag85A) kullanılarak hazırlanmış rekombinant ve DNA aşıları bulunmaktadır. DNA aşıları yapıldıktan 90 gün sonrasına kadar etkili bir bağışıklık sağladığı bildirilse de (18,23); bu aşılar *M. marinum* ile enfekte çizgili levreklerde hastalığa karşı koruma sağlayamamıştır (24). Toranzo ve ark. (28) ise şu an için bu hastalığa karşı etkili bir aşının olmadığını savunmuşlardır.

Sonuç

Mikobakteriyoz, dünya genelinde gerek doğal gerekse yetiştiriciliği yapılan (akvaryum gibi) balıklarda görülen önemli bir hastalıktır. Hastalığın enfekte hayvanlardan insanlara geçmesi sebebiyle zoonotik özellik taşıması da önemini ayrıca bir kat daha artırır. Hastalıkla ilgili yüzyıla yakın bir süredir gerek mücadele gerekse tedavisi üzerinde çalışılsa da, etken halen kendini kullanan ilaçlara karşı savunma yönünde geliştirmeye devam etmektedir. Bu nedenle de hastalık halen balık yetiştiriciliğinde güncelliğini ve önemini korur. Hastalığı oluşturan Mikobakteri türlerine ilişkin halen taksonomi çalışması ise devam etmektedir. Tüm bu gelişmelere ek olarak, hastalığa karşı etkili bir tedavi ve korunma, hastalığın kontrol önlemleri ve hastalığın teşhisine yönelik yeni ve uygun metotların da geliştirilmesi gereklidir. Bu da ancak modern moleküler tanı yöntemleri, epidemiyolojik teknikler ve uygun bir vaksinoloji ile mümkün olacaktır.

Kaynaklar

1. Aldabagh BA, Tomecki KJ. Cutaneous nontuberculous mycobacterial infections. *Dermatol Nurs* 2009; 21(4):179-82.
2. Anonim. Mycobacteriosis. <https://www.theaquariumwiki.com/Mycobacteriosis>, Erişim tarihi: 08.09.2016.
3. Arda M. Balıklarda Bakteriyel, Mantar, Viral ve Ekolojik Nedenlerden İleri Gelen Hastalıklar ve Tedavileri. Ankara: Ankara Üniversitesi

Veteriner Fakültesi Yayınları, 1974; s. 71-4.

4. Arda M, Seçer S, Sarıeyüpoğlu M. Balık Hastalıkları. Ankara: Medisan Yayınevi, 2005; ss. 68-70.
5. Astrid MVDS, Abdallah MA, Marion S, Eric R, Christins MJE, Vanderbroucke G, Wilbert B. *Mycobacterium marinum* strains can be divided into two distinct types based on genetic diversity and virulence. *Infect Immun* 2004; 72(11): 6306-12.
6. Aydın N, İzgür M, Diker KS, Yardımcı H, Esendal Ö, Paracıkoğlu J, Akan M. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). Ankara: İlke-Emek Matbaacılık ve Yayıncılık, 2006; ss. 87-107.
7. Barker LP, Brooks DM, Small PLC. The identification of *Mycobacterium marinum* genes differentially expressed in macrophage phagosomes using promoter fusions to green fluorescent protein. *Mol Microbiol* 1998; 29(5): 1167-77.
8. Baş B. Balıklarda ve sularda mikobakterilerin PCR-RFLP analizi ile incelenmesi, Doktora tezi, Ankara Üniv Sağ Bil Ens, Ankara 2011; ss. 1-25.
9. Baş B. Balıklarda Tüberküloz ve halk sağlığı yönünden önemi. *Journal of NFRL* 2011; 2 (4):21-6.
10. Baş B. Japon balıklarında (*Carrasius auratus*) *Mycobacterium* spp. izolasyonu. *Bornova Vet Bil Derg* 2013; 35(49): 25-30.
11. Bragg RR, Huchzermeyer HFAK, Hanisch MAM. *Mycobacterium fortuitum* isolated from three species of fish in South Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 1990; 57(1): 101-2.
12. Chinabut S. Mycobacteriosis and nocardiosis. Woo PTK, Bruno DW. eds. In: *Fish Diseases and Disorders*, Volume 3. New York: CABI Publishing, 1999; pp. 319-40.
13. Clark RB, Spector H, Friedman DM, Oldrati KJ, Young CL, Nelson SC. Osteomyelitis and synovitis produced by *Mycobacterium marinum* in a fisherman. *J Clin Microbiol* 1990; 28 (11): 2570-2.
14. Decostere A, Hermans K, Haesebrouck F. Piscine mycobacteriosis: A literature review covering the agent and the disease it causes in fish and humans. *Vet Microbiol* 2004; 99 (3): 159-66.
15. Floyd RF, Yanong R. Mycobacteriosis in Fish, <http://edis.ifasiufl.edu> Erişim tarihi: 18.04.2016.
16. Francis-Floyd R. Mycobacterial infections of

- Fish. Southern Regional Aquaculture Center Publication No: 4706, 2011. pp.1-12
17. Frerichs GN, Roberts RJ. The bacteriology of teleost. Roberts RJ. eds. In: Virology of Fish Pathology. UK: Bailliere Tindall, 1989. pp. 317-8.
 18. Gauthier DT, Rhodes MW. Mycobacteriosis in fishes: A review. The Vet J 2009; 180(1): 33-47.
 19. Ingles V, Roberts RJ, Bromage NR. Bacterial Diseases of Fish. Cambridge; Blackwell Science, 1994; pp. 3-22.
 20. Kawakami K, Kusuda R. Efficacy of rifampicin, streptomycin, and erythromycin against experimental mycobacterium infection in cultured yellowtail. Nippon Suisan Gakk 1990; 56(1): 51-3.
 21. Lewis FMT, Marsh BJ, Reyn CF. Fish exposure and cutaneous infections due to *Mycobacterium marinum*: Tuberculin skin testing, treatment and prevention. Clin Infect Dis 2003; 37(3): 390-7.
 22. Mainous ME, Smith SA. Efficacy of common disinfectants against *Mycobacterium marinum*. J Aquat Anim Health 2005; 17(3): 284-8.
 23. Pasnik DJ. Immunologic and protective effects of vaccines for *Mycobacterium marinum* in Morone sp. <http://scholar.lib.vt.edu>, Erişim tarihi: 18.04.2016.
 24. Pasnik DJ, Vemulapalli R, Smith SA, Schurig GG. A recombinant vaccine expressing a mammalian Mycobacterium sp. antigen is immunostimulatory but not protective in striped bass. Vet Immunol Immunopathol 2003; 95(1): 43-52.
 25. Taalat AM, Reimschuessel R, Wasserman SS, Trucksis M. Goldfish, *Carassius auratus*, a novel animal model for the study of *Mycobacterium marinum* Pathogenesis. Infect Immun 1998; 66(6): 2938-42.
 26. Thariat J, Leveque L, Tavernier C, Maillefert JF. *Mycobacterium marinum* tenosynovitis in a patient with Still's disease. Rheumatology 2001; 40(12): 1419-20.
 27. Toranzo AE. A Review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. Aquaculture 2005; 246(1): 37-61.
 28. Toranzo AE, Romalde JL, Magarinos B, Barja JL. Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. Options Mediterraneennes 2009; 86: 155-76.
 29. Ucko M, Colorni A, Kviit H, Diamant A, Zlotkin A, Knibb WR. Strain variation in *Mycobacterium marinum* fish isolates. Appl Environ Microbiol 2002; 68(11): 5281-7.
 30. Ucko M, Colorni A. *Mycobacterium marinum* infections in fish and humans in Israel. J Clin Microbiol 2005; 43(2): 892-5.
 31. Van Duijn C. Tuberculosis in fishes. J Small Anim Pract 1981; 22: 391-411.
 32. Yanong RPE, Curtis EW, Terrell SP. Atypical presentation of mycobacteriosis in a collection of frogfish (*Antennarius striatus*). J Zoo Wildl Med 2003; 34(4): 400-7.

Sorumlu Yazar:

Doç. Dr. Levent ALTINTAŞ

Ankara Üniversitesi,

Veteriner Fakültesi,

Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı

Ankara-TÜRKİYE

Tel: 0312 317 03 15 / 4437

E-posta: leventaltintas@hotmail.com



Veteriner Dermatolojide Ultrason Kullanımı

Duygu TARHAN¹, Onur İSKEFLİ², Lora KOENHEMSİ², Mehmet Erman OR², Ümit Bora BARUTÇU¹

¹İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Fatih, İstanbul-TÜRKİYE

²İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Avcılar, İstanbul-TÜRKİYE

Özet: Ultrasonografi invazif olmayan görüntüleme yöntemi olarak beşeri ve veteriner hekimlikte yaygın şekilde uzun yıllardır kullanılmaktadır. İç organların görüntülenerek incelenmesi, ultrasonografi eşliğinde biyopsi alınması ve fizik tedavi amaçlı kullanımının yanı sıra son yıllarda teknolojik ilerlemelerle dermatolojide de yüksek-çözünürlüklü ultrasonik (HRU) görüntüleme uygulamaları yapılmaya başlanmıştır. Normal deri (epidermis, dermis, subkutan doku) kalınlığının belirlenmesi, yaşlanma ve çeşitli iç-dış uyaranlara karşı kalınlıktaki değişiklikler, venöz ülserler, benign ve malign oluşumlar, psoriasis, tırnak hastalıkları, kıl folliküllerinin incelenmesi ve deri içine yerleşen eksojen materyallerin tespiti için kullanılan ultrasonografi beşeri hekimlikteki dermatoloji alanından örneklendirilmiştir. Ayrıca yüksek-çözünürlüklü ultrasonografi güvenilir bir şekilde tümör kalınlıklarını ölçmede ve seboreik keratoz, melanom, benign tümörler arasındaki farkı göstermede de yararlı olacağı düşünülmektedir. Bu derlemenin amacı veteriner alanında gittikçe artan dermatolojik problemi olan hastaların tanı ve ayırıcı tanısında ultrason kullanımı hakkında bilgi verip rutin dermatolojik klinik çalışmalar arasına bu yöntemin de eklenmesini sağlamaktır.

Anahtar kelimeler: Deri hastalıkları, HRU, ultrason, veteriner dermatoloji

Use of Ultrasound in Veterinary Dermatology

Summary: Ultrasonography is widely used as a non-invasive imaging method for many years in human and veterinary medicine. In addition to imaging of internal organs, ultrasound guided biopsy, and its usage for physiotherapy, new technological advances have enabled high-resolution ultrasound imaging (HRU) applications for dermatology in recent years. Ultrasonography is exemplified from human medicine for dermatological problems such as the determination of normal skin thickness (epidermis, dermis, subcutaneous tissue), the changes of skin thickness against various internal-external stimuli and aging, venous ulcer, benign and malignant growths, psoriasis, nail diseases, investigation of hair follicles and the detection of exogenous materials settled into the skin. HRU reliably measures tumour thickness and is also considered to be beneficial to show the difference among seboreic keratosis, melanoma and benign tumours. The aim of this review article is to give information about the use of ultrasound in the diagnosis and differential diagnosis of dermatological problems in increasing numbers of veterinary patients and to introduce the use of this method into routine dermatological clinical studies as a diagnostic method.

Key words: HRU, skin diseases, ultrasound, veterinary dermatology

Giriş

Ultrasonografi hastaya herhangi bir yan etkisi olmadığından dolayı hastalığın tanı ve takibinde güvenle kullanılan bir görüntüleme yöntemidir. Ayrıca invazif olmayan ultrasonografi ile görüntüleme kantitatif parametrelere sahiptir. Ultrasonografi ekipman ve donanımları, deri katmanlarının üç boyutlu yeniden yapılandırılması ve kesit görüntüsünü elde etmek için kullanılmaktadır. Dermatolojide ultrasonografi uygulamaları son zamanlarda daha yeni ve daha ileri teknolojiye cihazların geliştirilmesi sayesinde yüksek ve değiştirilebilir frekansa sahip problemlerin üretilmesiyle artış gösterir. Ayrıca teknolojinin ilerlemesiyle beraber ultrasonografi deri, tırnak ve saçta bile ölçüm yapılabilmesine olanak verir (12,29,31,35).

Tıpta tanı amaçlı görüntüleme yapabilmek için kullanılan ultrason, genel olarak 2-15 MHz frekanslı bir ses dalgasıdır. Ultrasonografi vücuda çok yüksek frekanslı olan ultrason dalgalarını göndererek farklı doku yüzeylerinden gelen yansımaları tespit etme esasına dayanan bir görüntüleme yöntemidir.

Sesin hızı, ses dalgasının frekansı ve dalga boyunun çarpımına eşittir ve ortamların farklı yoğunluklarına göre değişim gösterir. Bu değişime yansıma, kırılma ya da ikisi beraber neden olabilir. Ayrıca açılardaki değişime göre ses farklı yapılar tarafından absorbe edilir (5,20,21). Frekans artışının çözünürlüğü geliştirmesinden dolayı yapılar arasındaki farklılıkları ayırt edebilme yeteneğini de artırır. Fakat daha yüksek bir frekans ses dalgasının girinim derinliğini azaltır. Ancak, uygun frekansta kullanılan ultrasonografi, yapısal farklılığa ışık tutabilme potansiyeline

sahiptir (2,5,20).

Problarda kullanılan frekans, dokunun kalınlığına göre farklılık gösterir. Frekansın yüksek olması çözünürlüğün yüksek olmasını sağlarken, absorpsiyonun artmasıyla beraber penetrasyonun azalmasına neden olur. Bu yüzden deride yapılan incelemelerde diğer bölgelere kıyasla daha yüksek frekanslar kullanılır (20,25). Deri genel olarak epidermis, dermis ve subkutan tabakalarından oluşmaktadır. Bu tabakaların kalınlıkları bölgesel olarak farklılık göstermektedir. Örneğin ayak tabanı epiderminin en kalın olduğu yer iken, göz kapağında epidermis tabakası oldukça incedir (13). Deri üzerinde uygulanan ultrasonun frekans değerlerine göre penetrasyon derinlikleri ve derinin görüntülenebilen katmanları genel olarak Tablo 1'de özetlenmiştir (16).

Günümüzde çözünürlüğü mükemmel olan yüksek frekanslı problemler üretilmiştir. Tıbbi görüntüleme, 3.5-7.5 MHz'lik bir frekans yaklaşık ola-

görüntüsü görülmektedir. Şekil 1'de görüldüğü üzere deri yüzeyine prob ile kısa bir ultrason demeti gönderilir ve yansıyan demet bir sonraki demet gönderilmeden önce aynı prob tarafından yakalanır. Ultrasonu prob elektrik sinyallerine dönüştürür. Alınan elektriksel sinyal bir bilgisayara iletilir ve burada çeşitli işlemlerden geçirilip görüntü elde edilir (23).

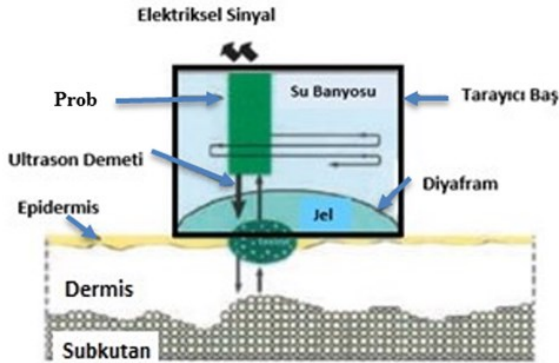
Dermatolojide Ultrason

Alexander ve Miller (1) 1979 yılında 10 sağlıklı insan üzerinde deri kalınlığının belirlenmesi için yaptıkları çalışmada A-modu ultrasonografiyi ilk defa kullanmışlardır. Deri ultrasonografisi 1983 yılına kadar neredeyse sadece deri kalınlığının belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Dubois ve Garel (11) tarafından 1999 yılında yapılan vasküler malformasyonların görüntülenmesi ve tedavi sürecinde ultrason kullanımının önemini ileri süren yayınlarından bu yana dermatolojide vasküler anomalilerde kullanımı giderek önem kazanmıştır. Roldan ve ark. (26) 2016 yılında

Tablo 1. Ultrason frekansları ve penetrasyon derinlikleri (16)

Ultrason Frekansı (MHz)	Yaklaşık Penetrasyon Derinliği (cm)	Görüntüleme
7.5	> 4	Lenf düğümleri ve subkutan
13.5-50	3-0.3	Epidermis ve dermis
20	0.6-0.7	Epidermis ve dermis
50-100	0.3-0.015	Sadece epidermis

rak 2-3 mm'lik bir çözünürlüğe sahiptir. Deri görüntüleme 15 MHz ve üzeri yüksek bir frekans yaklaşık olarak 60-120 µm'nin çözünürlüğünü ortaya koymakta kullanılır. Buna yüksek çözünürlüklü ultrasonografi (High Resolution Ultrasound-HRU) denir ve Şekil 1'de şematik



Şekil 1. Yüksek Çözünürlüklü Ultrasonografinin Şematik Gösterimi (23)

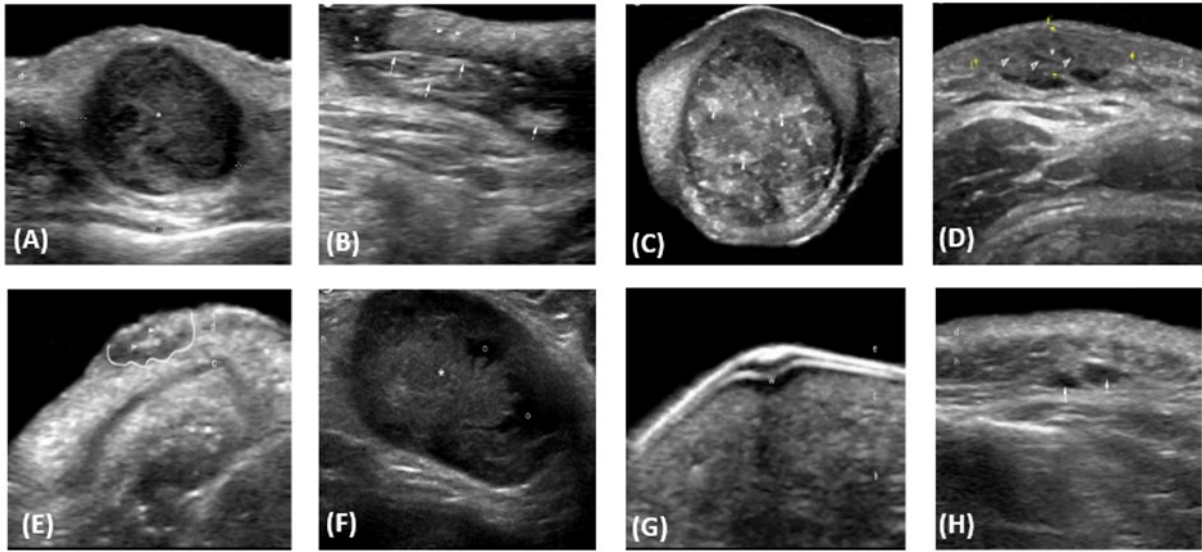
yayınlanmış olduğu derlemede vasküler anomalilerde ultrasonografinin önemi ve bu alandaki ultrason kullanımında son gelişmeler aktarılmıştır. Epidermal kistli hastalar üzerine yapılan çalışmalarda kistin tanısında ultrasonografik bulguların faydalı olabileceği görüşüne varılmıştır (15). Epidermal kistli 594 hastadan sadece cerrahi işlem öncesi ultrasonografik muayene yapılmış olan 46 tanesi (15 kadın, 31 erkek hasta) üzerinde 2012 yılında yayınlanan çalışmada ruptur görülen ve görülmeyen epidermal kistlerin ultrasonografik özelliklerinde farklılıklar tespit etmeyi amaçlamışlardır. Epidermal kistlerin ultrasonografik özelliklerindeki tümör boyutu, konumu, perikistik değişimler, sınırları, şekli gibi farklılıkların belirlenmesinin doğru teşhis konulmasında destek sağlayacağı görüşüne ulaşılmıştır (37). Creel ve ark. (7) 2009 yılındaki yayınlarında ise ele gelmeyen ve deri içine yerleşen dış kaynaklı materyallerin tespitinde ultrasonografik bir teknik kullanılmıştır.

Verruca plantaris adı verilen el ve ayak tabanının

da görülen siğiller üzerine ultrason taraması ile morfolojik özelliklerin anlaşılması ve siğil tedavisine ışık tutması amacıyla yapılan çalışmada normal taban derisi ve siğilli tabanın şekil, lezyondaki kan akışı, deri katmanlarının birbiri ile ilişkisi ve ekojenitelerini içeren ultrasonografik özellikleri tanımlanmıştır. Sonuç olarak ultrasonografinin verruca plantaris teşhisinde güvenilir

lomatriksoma, dermatofibroma, bazal hücre karsinoması, melanoma, siğil ve hiyaluronik asit ile ilgili ultrason ile elde edilen görüntüler Şekil 2'de verilmiştir (30). Dolayısıyla bu ultrasonografi görüntülerinin her biri aslında teşhis ve tedavi için önemli verilerdir.

Veteriner hekimlik alanında ise ilk olarak 1988 yılında Dicker ve ark. (10) sığırlarda subkutan



Şekil 2: Ultrason görüntüleri. (A) epidermal kist (sol yanak); (B) pilonidal kist (intergluteal bölge); (C) pilomatriksoma (sağ kulak memesi); (D) dermatofibroma (sol omuz); (E) bazal hücre karsinoması (sol kulak kepçesinin arkası); (F) melanoma (karın duvarı); (G) siğil (sol ayak tabanı); (H) hiyaluronik asit (sol perioküler bölge) (30)

bir yöntem olabileceği ve terapötik cevapların görüntülenmesine izin vermesi ile tedavi yöntemlerinin değerlendirilmesinde rol alabileceği ileri sürülmüştür (31).

Kozmetik dolgu maddelerinin tanımlanması ve deride tespit edilmesi ile yumuşak doku ve deri lezyonlarının teşhisinde ultrasonografinin kullanımını üzerine çalışmalar da yapılmıştır (33,35). Teknolojik gelişmelerle beraber bu alandaki çalışmalar giderek artış göstermiştir. Ultrasonografinin dermatoloji alanında yapılan çalışmaları sadece deri üzerine değil, aynı zamanda tırnak ve saç üzerinde de yapılmıştır (27,31,34,36). Ayrıca bazal hücreli karsinomlar, metastazik tümörler, benign ve malign oluşumlar, venöz ülserler ve psoriasis gibi bir çok önemli deri hastalıklarının teşhisinde de ultrasonografi kullanımı üzerine olumlu sonuçlar gösteren çalışmalar yapılmıştır (6,14,17,19).

Ultrasonografinin, dermatolojide görüntüleme, teşhis ve tedavi takibindeki önemi yapılan çalışmalarla desteklenmektedir. Bu amaçla dermatoloji alanında epidermal kist, pilonidal kist, pi-

yağ kalınlığı ölçümünde ultrasonografi kullanmışlardır. Brown ve ark. (3) 2000 yılında 16 tane Merinos koyunu üzerinde yaptıkları çalışmada yine deri kalınlığı ölçümü yaptıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada ultrasonografi ve deri kıvrım kalınlığı ölçüm yöntemi kullanılarak yöntemler arasında karşılaştırmalar yapılmıştır. Çalışma sonucunda ultrasonografi ile deri kalınlığı ölçülebildiği ve diğer yöntemden çok daha fazla avantaj sağlayabileceği görüşüne varılmıştır.

Diana ve ark. (9) klinik olarak normal olan köpeklerin deri kalınlığının doğru ölçümü ve değerlendirilmesi için yüksek frekanslı diagnostik ultrasonografinin uygulanabilirliğini araştırmak üzere yaptıkları çalışmada farklı yaş ve türden 26 tane sağlıklı köpek kullanıp, aynı yerden alınan deri biyopsinin histomorfometrik analizi ve derinin ultrasonografik incelemeleri karşılaştırılmıştır. Çalışmada 13 MHz'lik bir doğrusal dizilimli prob kullanıldığı bildirilmiştir. Ultrasonografik ve histolojik karşılaştırmaların sonucunda tanı amaçlı ultrasonografinin köpeklerde kutanöz hastalıkların noninvazif değerlendirilmesin-

de yararlı bir araç olabileceği görüşüne varılmıştır.

Reetz ve ark. (24) ise köpekler için cilt flebi ek-senel modeli için yaygın olarak kullanılan direkt dört kutanöz arterin renkli Doppler ultrasonografik görüntülenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada klinik olarak normal 20 köpek kullanmışlardır. Çalışma sonucunda renkli Doppler ultrasonografik görüntülenmesi ve temel ultrasonografi kombinasyonunun kullanışlı bir yöntem olabileceği ifade edilmiştir.

Köpeklerin çeşitli kutanöz bölgelerindeki hidrasyon durumu ile ilgili deri kalınlığında oluşan değişiklikleri incelemek için yüksek frekanslı ultrasonografinin kullanışlı olup olmadığının incelenmesi amaçlanmış olan çalışmada, klinik olarak normal olan farklı ırklardan yetişkin 10 köpek kullanılmıştır. Derinin ultrasonografik incelenmesi için 13 MHz'lik doğrusal dizilimli bir prob kullanılarak dört farklı kutanöz bölgede hidrasyon öncesi ve sonrası olarak ultrasonografi görüntüleri alınmıştır. Çalışma sonucunda Diana ve ark. (8) teşhis amaçlı kullanılan ultrasonografinin deri hidrasyonunun invazif olmayan değerlendirilmede kullanışlı olabileceğini ifade etmişlerdir.

Zanna ve ark. (38) 2012 yılında Shar-Pei ırkı köpeklerde deri kalınlığının araştırılmasında yüksek frekanslı diagnostik ultrasonografinin faydalı olup olmadığını belirlemeyi amaçlamışlardır. Buna göre on sağlıklı Shar-Pei ırkı ve on sağlıklı Beagle ırkı köpek kullanıp deri üzerinde dört farklı bölgeden 13 MHz'lik doğrusal dizilimli bir prob kullanılarak ultrasonografik incelemeler yapılmıştır. Her bölgede üç ölçümün ortalaması alınarak hesaplamalar yapılmış ve ultrasonografik sonuçlar ile histolojik bulgular karşılaştırılmıştır. Ultrasonografinin deri kalınlığı ölçümünde faydalı bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

Yüksek frekanslı ultrasonografi kullanarak Mantis ve ark. (18) 2014 yılında Beagle ırkı av köpekleri üzerine yaptıkları çalışmada ise ultrasonografi kullanarak köpeklerin tüylü derisinin ekojenitesi tanımlamak ve donmuş biyopsi örneklerinde doku kalınlığının histolojik ölçümlerinin ultrasonografik olarak karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda av köpeklerinin derileri üzerinde sekiz farklı bölgede 50 MHz'lik polivini-lidin diflorür içeren prob kullanılarak ultrasonografik araştırmalar yapılmıştır. Biyopsinin alındığı yer, cinsiyet ve yaş durumlarına bakılarak ultrasonografik ve histolojik ölçümler arasındaki farklılıklar doğrultusunda ultrasonografinin deri katmanlarının tanımlanmasında, tüylü deri üzerin-

de çeşitli bölgelerde kıl follikülleri tespitinde ve ayrıca normal köpek derisinin kalınlığının ölçümünde kullanışlı bir yöntem olduğu görüşüne varılmıştır.

Bunun dışında Payan-Carreira ve ark. (22) 28 köpek üzerinde 6-11 MHz'lik gerçek zamanlı ultrasonografi kullanarak çeşitli bölgelerde deri altı yağ kalınlığı ölçümü gerçekleştirmişlerdir. Yapılan bu ön çalışma ile ultrasonografinin vücut kondisyon puanlamasından elde edilen verilerle karşılaştırıldığında yağ kalınlığındaki değişimleri daha hassas bir şekilde ölçebildiği ifade edilmiştir.

Ayrıca küçük hayvanlarda da ultrasonografi kullanımı ile deri altı yağ kalınlığı ölçümü üzerine çalışmalar yapılmıştır. Borges ve ark. (4) 6-8 MHz'lik bir ultrasonografi probu kullanarak gonadektomi yapılmış obez 16 kedi üzerinde yağ kalınlığı ölçümü ve görüntülerinden faydalanmıştır.

Sonuç

Ultrasonun dermatolojide teşhis amaçlı kullanımı üzerine yapılan çalışmalar deri kalınlığı ölçümleri ile başlayıp tümör kalınlığı ölçümü ile benign ve malign oluşumların tespitine ve hastalığın iyileşme süreci takibine kadar birçok alanda kullanılmıştır. Teknolojinin ilerlemesi, iyonizan radyasyon yaymayan, güvenilir, hastalığın tanı ve takibinde oldukça kolaylık sağlayan ultrasonografiye veteriner dermatoloji alanında daha çok önem verilmelidir. Sonuç olarak beşeri hekimlikte dermatoloji alanında yapılan çalışmalar gibi birçok uygulamanın veteriner hekimlik alanında da yapılabileceği, ultrasonografinin dermatolojik rutin klinik çalışmalarında yer alabileceği ve veteriner dermatoloji alanında teşhis ve tedaviye ışık tutabileceği görüşündeyiz.

Kaynaklar

1. Alexander H, Miller DL. Determining skin thickness with pulsed ultrasound. J Invest Dermatol 1979; 72(1): 17-9.
2. Bamber JC. Acoustical Characteristics of Biological Media. Crocker MJ. ed. In: Encyclopedia of Acoustics. New York: John Wiley & Sons Inc, 1997; pp. 1703-26.
3. Brown DJ, Wolcott ML, Crook BJ. The measurement of skin thickness in Merino sheep using real time ultrasound. Wool Tech Sheep Bree 2000; 48(4): 269-76.
4. Borges N, Vasconcellos RS, Carciofi AC, Gonçalves KNV, Paula FJA, Faria Filho DE, Canola JC. DXA, bioelectrical impedance, ultrasonography and biometry for the esti-

- mation of fat and lean mass in cats during weight loss. *BMC Vet Res* 2012; 8(1): 111.
5. Cammarota T, Pinto F, Magliaro A, Sarno A. Current uses of diagnostic high-frequency US in dermatology. *Eur J Radiol* 1998; 27(2): 215-23.
 6. Carrascosa R, Alfageme F, Roustán G, Suarez MD. Skin ultrasound in Kaposi sarcoma. *Actas Dermosifiliogr* 2016; 107(4): e19-e22.
 7. Creel SA, Girish G, Jamadar DA, Morag Y, Jacobson JA. Sonographic surface localization of subcutaneous foreign bodies and masses. *J Clin Ultrasound* 2009; 37(3): 158-60.
 8. Diana A, Guglielmini C, Fracassi F, Pietra M, Balletti E, Cipone M. Use of high-frequency ultrasonography for evaluation of skin thickness in relation to hydration status and fluid distribution at various cutaneous sites in dogs. *Am J Vet Res* 2008; 69(9): 1148-52.
 9. Diana A, Preziosi R, Guglielmini C, Degliesposti P, Pietra M, Cipone M. High-frequency ultrasonography of the skin of clinically normal dogs. *Am J Vet Res* 2004; 65(12): 1625-30.
 10. Dicker RW, Fowler DG, Perry D, Sundstrom B. Accuracy of real-time ultrasound systems for fat thickness estimation in live cattle. *Pro Aust Soc Anim Pro* 1988; 17(1): 178-81.
 11. Dubois J, Garel L. Imaging and therapeutic approach of hemangiomas and vascular malformations in the pediatric age group. *Pediatr Radiol* 1999; 29(12): 879-93.
 12. Erturen İ, Yıldırım M. Dermatolojide ultrasonografi kullanımı. *Türkderm* 2007; 41(1): 3-6.
 13. Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Structural characteristics of the aging skin: A review. *Cutaneous Ocul Toxicol* 2007; 26(4): 343-57.
 14. Gutierrez M, Wortsman X, Filippucci E, De Angelis R, Filosa G, Grassi W. High-frequency sonography in the evaluation of psoriasis: Nail and skin involvement. *J Ultrasound Med* 2009; 28(11): 1569-74.
 15. Jin W, Ryu KN, Kim GY, Kim HC, Lee JH, Park JS. Sonographic findings of ruptured epidermal inclusion cysts in superficial soft tissue: Emphasis on shapes, pericyclic changes, and pericyclic vascularity. *J Ultrasound Med* 2008; 27(2): 171-6.
 16. Kleinerman R, Whang TB, Bard RL, Marmur ES. Ultrasound in dermatology: Principles and applications. *J Am Acad Dermatol* 2012; 67(3): 478-87.
 17. Mandava A, Ravuri PR, Konathan R. High resolution ultrasound imaging of cutaneous lesions. *Indian J Radiol Imaging* 2013; 23(3): 269-77.
 18. Mantis P, Tontis D, Church D, Lloyd D, Stevens K, Balomenos D, Gouletsou PG, Giannouloupoulos G, Doukas D, Galatos AD, Sari-domichelakis M. High-frequency ultrasound biomicroscopy of the normal canine haired skin. *Vet Dermatol* 2014; 25(3): 176-81.
 19. Myers KA, Ziegenbein RW, Zeng GH, Matthews PG. Duplex ultrasonography scanning for chronic venous disease: Patterns of venous reflux. *J Vasc Surg* 1995; 21(4): 605-12.
 20. Or ME. *Medikal Fizik*. İstanbul: Teknik Yayın 2005; ss. 166-9.
 21. Oyar O. *Radyolojide Temel Fizik Kavramlar*. Birinci Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 1998; ss. 213-43.
 22. Payan-Carreira R, Martins L, Miranda S, Olivério P, Silva RS. In vivo assessment of subcutaneous fat in dogs by real-time ultrasonography and image analysis. *Acta Vet Scand* 2016; 58(Suppl 1): 58.
 23. Rallan D, Harland CC. Ultrasound in dermatology-basic principles and applications. *Clin Exp Dermatol* 2003; 28(6): 632-8.
 24. Reetz JA, Seiler G, Mayhew PD, Holt DE. Ultrasonographic and color-flow doppler ultrasonographic assessment of direct cutaneous arteries used for axial pattern skin flaps in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2006; 228(9): 1361-5.
 25. Roldan FA. Ultrasound skin imaging. *Actas Dermosifiliogr* 2014; 105(10): 891-9.
 26. Roldán FA, Fernández IS, Garza FZM, Gullón GR. Update on the use of ultrasound in vascular anomalies. *Actas Dermosifiliogr* 2016; 107(4): 284-93.
 27. Thomas L, Vaudaine M, Wortsman X, Jemec GBE, Drape JL. Imaging the nail unit. In: Baran R, de Berker DAR, Holzberg M, Thomas L. eds. *In: Baran & Dawber's Diseases of the Nails and their Management*. Oxford: Blackwell Publishing, 2012; pp.132-53.
 28. Williams D. The physics of ultrasound. *Anaesth Intensive Care* 2012; 13(6): 264-8.

29. Wortsman X. Common applications of dermatologic sonography. *J Ultrasound Med* 2012; 131(1): 97-111.
30. Wortsman X. Ultrasound in Dermatology: Why, how, and when? *Semin Ultrasound CT MRI* 2013; 34(3): 177-195.
31. Wortsman X, Jemec GBE. Ultrasound imaging of nails. *Dermatol Clin* 2006; 24(3): 323-8.
32. Wortsman X, Sazunic I, Jemec GB. Sonography of plantar warts: Role in diagnosis and treatment. *J Ultrasound Med* 2009; 28(6): 787-93.
33. Wortsman X, Wortsman J. Polyacrylamide fillers on skin ultrasound. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012; 26(5): 660-1.
34. Wortsman X, Wortsman J, Matsuoka L, Saavedra T, Mardones F, Saavedra D, Guerrero R, Corredoira Y. Sonography in pathologies of scalp and hair. *Br J Radiol* 2012; 85(1013): 647-55.
35. Wortsman X, Wortsman J, Orlandi C, Cardenas G, Sazunic I, Jemec GB. Ultrasound detection and identification of cosmetic fillers in the skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012; 26(3): 292-301.
36. Wortsman X, Wortsman J, Soto R, Saavedra T, Honeyman J, Sazunic I, Corredoira Y. Benign tumors and pseudotumors of the nail: A novel application of sonography. *J Ultrasound Med* 2010; 29(5): 803-16.
37. Yuan WH, Hsu HC, Lai YC, Chou YH, Li AF. Differences in sonographic features of ruptured and unruptured epidermal cysts. *J Ultrasound Med* 2012; 31(2): 265-72.
38. Zanna G, Fondevila D, Ferrer L, Espada Y. Evaluation of ultrasonography for measurement of skin thickness in Shar-Peis. *Am J Vet Res* 2012; 73(2): 220-6.

Sorumlu Yazar:

Prof. Dr. Mehmet Erman OR
İstanbul Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
İç Hastalıkları Anabilim Dalı,
İstanbul-TÜRKİYE
Tel: 0212 473 70 00 / 17279
E-posta: ermanor@istanbul.edu.tr



Gıdalarda Kimyasal Kalıntılar ve Analiz Metotları

Yusuf DOĞAN¹, Feride KOÇ²

¹Kayseri Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü, Kayseri-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji ABD, Kayseri-TÜRKİYE

Özet: Hem hayvanlarda hem de bitkilerde kullanılan ilaç ve kimyasallar besin zincirine girerek birikim yapmaktadırlar. Hayvansal kökenli gıdalardaki bu ilaç ve pestisit kalıntıları, canlı sağlığı ve ülke ekonomisi açısından risk oluşturmaktadır. Bu nedenle kimyasal kalıntının analizi önem arz etmektedir. Bu derlemede, gıdalardaki kimyasal kaynaklı kalıntılardan olan veteriner ilaç kalıntıları, pestisitler gibi çevresel kirleticilerin kalıntıları ve kalıntı analiz metotları hakkında bilgi verilecektir.

Anahtar kelimeler: Analiz, gıda, kalıntı, kimyasal, metot

Chemical Residues and Analysis Methods in Foods

Summary: Used drug and chemicals in both animals and plants areas have entered and accumulated to food chain. These drug and pesticide residues in animal origin food cause risk in live health and economic of country. Therefore, it is important to analyze the chemical residue. In this review, chemical residues of veterinary drug residues in foods that are sourced from the residue of environmental pollutants such as pesticides and will be given information about the methods of analysis.

Key words: Analysis, chemical, food, method, residue

Giriş

Veteriner hekimlik ya da zirai mücadele amacıyla kullanılan ilaç ve kimyasal maddelerin çoğu, uygulandıkları hayvan ya da bitkilerin yapısında kısmen parçalanarak etkisiz hale gelirken, özellikle pestisit ya da çevresel kirletici olarak bilinen maddeler son derece yavaş ayrışmaları nedeniyle, giderek artan miktarlarda birikerek gıda zincirine girerler. İnsanlara kadar ulaşarak halk sağlığı ve diğer canlılar içinde risk faktörü oluştururlar (5,31). Kalıntı olarak adlandırılan bu maddeler aslında, dokuları ya da ürünleri gıda olarak tüketilebilen hayvanlarda, hastalıklardan korunmak, tedavi etmek ve gelişmenin hızlandırılması amacıyla kullanılan pek çok ilaç, hormon, vitamin ve mineral maddelerin hayvanlara uygulandıktan sonra vücutlarında biriken serbest ya da bağlı haldeki değişmemiş ana madde ve metabolitleridir (18). Bu terim; pestisitleri ve toksikolojik açıdan öneme sahip tüm çevresel kirleticileri de kapsar. En çok kalıntı problemi oluşturan maddeler ise; antibakteriyel maddeler, antihelmintikler, antikoksidaller, sedatifler, nonsteroidal yangı gidericiler gibi veteriner ilaçları (12), bazı pestisitler (organik klorlu, fosforlu, karbamatlı ve piretroidler gibi) (2,3), poli klorlu

bifenil (PCB)'ler (15,21), dioksinler (24), mikotoksinler, ağır metaller ve boyalar gibi çevre kirleticilerdir (19). Hayvanlarda bilinçli ya da bilinçsiz olarak çeşitli amaçlarla başta antibakteriyel ve antiparaziter ilaçlar yaygın bir şekilde kullanılmakta olup, hayvansal ürünlere kalıntı şeklinde yansımaktadır (1). İnsanlara besin zinciri yoluyla geçen bu kalıntılar ciddi problemlere sebep olabilmektedir (7,9). Gıdalardaki ilaç, pestisit ve çevresel kirletici kalıntıları insan sağlığı; ülke ekonomisi ve uluslararası boyutu yönüyle değerlendirildiğinde, oldukça kaygı verici boyutlarda olduğu görülmektedir (13). Gıdalarda ilaç kalıntılarının varlığı ülkemizin Avrupa Birliği'ne adaylık sürecinde de güncelliğini korumaktadır. Bu durumda, veteriner hekimliği ilaçlarının hayvanlarda bilinçli ve kontrollü kullanımı (12,19) ile gıdalarda kalıntı düzeylerinin geçerli yöntemlerle izlenmesi (20,23,32) ve tolerans seviyelerine uygunluğu son derece önem arz etmektedir (5,18).

İlaç kalıntılarının sebepleri, hayvanlara ilaç uygulamalarından sonra belli bir süre geçmeden kesilmesi ya da ilaç kullanılan bu hayvanlardan elde edilen hayvansal orijinli gıdaların (et, süt, yumurta, balık vb.) insanlar tarafından tüketilmesi, hayvanlarda kullanılan ilaç dozlarının ve doz aralığının onaylanmış miktarından daha yüksek ve daha sık uygulanması, ruhsatsız ilaç

kullanılması, hedef hayvan türü için hatalı ilaç, müstahzar veya formülasyon seçilmesidir (19,34).

Kalıntı risk değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan ifadeler şunlardır:

Kabul edilebilir günlük alım (KGA): Bir ilaç ya da kimyasal bir maddenin, gıdalar ve içme suları ile tüketicilerin vücuduna aldıklarında onların sağlığı üzerinde risk oluşturmayan, ömür boyunca "günlük" olarak tüketilebilecek miktarını ifade eder. Birimi, mg/kg c.a. gün'dür (7,11,19,38). Bir maddenin KGA miktarını belirlemek için, o maddenin canlıda kronik denemeler sonucu etki oluşturmayan düzeyi (NOEL) ve güven faktörü belirlenmelidir. KGA = Etkisiz düzey/Güven faktörü (11).

Güven faktörü: Güven faktörü, canlılarda türler arası ve tür içi en az 10 kat fark olacağı dikkate alınarak belirlenir. KGA hesaplanmasında kullanılmak üzere, kanserojen olmayan bir ilaç ya da kimyasal maddenin en az iki memeli hayvan türünde (biri kemirici olmak üzere) ömür boyu ya da kronik yedirme denemelerine göre, insanları en duyarlı hayvan türüne göre bir maddeye 10 kez daha duyarlı olabileceği (1/10) ve insanlar arasında da 10 kata kadar duyarlılık farkı olabileceği düşünülerek güvenlik faktörü 1/100 (1/10X1/10 =1/100) olarak belirlenir (19,35).

Tolerans düzeyi (Maksimum kalıntı seviyesi): Gıda, içme suyu ve yemlerde kalıntı olarak biriken bir ilaç veya kimyasalın, hem kendilerinin hem de metabolitlerinin tüketicilerde toksikolojik zarar oluşturmayan ve tüketici tarafından alınmasına yasal olarak müsaade edilen en fazla kalıntı miktarı veya yoğunluğu olarak tanımlanır. Birimi mg/kg c.a. olarak ifade edilir (28,35). Tolerans düzeyi *sınırlı, ihmal edilebilir, sıfır* ve bazen de *geçici tolerans* diye dört tip olarak uygulanır. Bunlardan en önemlisi sıfır tolerans olup, gıdalarda bu maddelerin hiçbir seviyede bulunmaması gerektiği anlamına gelir (30). Sıfır tolerans düzeyine sahip bazı maddeler şunlardır: Stilbenler, derivatları, tuzları ve esterleri, antitroidal maddeler, steroidler, zeranol dahil olmak üzere resorsilik asit laktonlar, beta-agonistler, aristolochia türleri ve bundan hazırlananlar, kloramfenikol, kloroform, klorpromazin, kolsişin, dapson, dimetridazol, metronidazol, nitrofuran, furazolidon ve ronidazol (30,38). Bugün ülkemizde Avrupa Birliği Direktifleri (EEC 2377/90)'ne uygun olarak 2002/30 no'lu Türk Gıda Kodeksi tebliği hazırlanmış ve bu maddelerin tolerans düzeyleri dört başlık halinde listelenmiştir

(8,30). Bunlardan; Ek I; maksimum kalıntı *limiti belli* olan farmakolojik etkili maddeler, Ek II; maksimum kalıntı *limiti olmayan* farmakolojik etkili maddeler, Ek III; maksimum kalıntı *limiti geçici* olarak belirlenen farmakolojik etkili maddeler, Ek IV; gıdalarda *hiçbir seviyede bulunmaması gereken (yasak)* farmakolojik etkili maddelerdir (30).

Kesim öncesi bekleme süresi: Doku ve organları gıda maddesi olarak tüketilen, yumurta, süt, bal, balık gibi ürünlerden faydalanılan hayvanlarda koruyucu ve tedavi edici amaçla kullanılan ilaçların uygulandıktan sonra bu gıdaların tüketime sunulması için geçmesi gereken süreye denir. Yani, ilaç uygulamasının sona erdiği zaman ile tüketime sunulan zaman arasındaki süreyi ifade eder. Bu süreler yasal olarak her ilaç için belirlenmiştir (13). Aşağıdaki formülle hesaplanır. Kesim öncesi bekleme süresi=1.44Xln (ilacın vücuttaki başlangıçtaki konsantrasyonu/tolerans düzeyi)Xbiyolojik yarı ömrü. Ancak ilaçla ilgili herhangi bir süre henüz belirlenmemişse kanatlı ve memeliler için bu süre geçici olarak 28 gün, yumurta ve süt için 7 gün, balıklar için de 500 derece gün (Bu rakam yetiştirme suyunun sıcaklığına bölünerek tüketilmemesi gereken süre gün olarak belirlenir) (1). Kesim öncesi bekleme süresini etkileyen faktörler ise ilacın farmakokinetiğini etkileyen faktörlerdir ve bu faktörlerin ilacın kinetiğini nasıl etkilediği ve kalıntı seviyelerini nasıl değiştirdiği, sonuçta da kesim öncesi bekleme süresini etkileyebileceği göz önüne alınmalıdır. İlacın fiziko-kimyasal özelliği (lipofilite, pH v.b), ilacın vücuttaki dağılım hacmini etkiler dağılım hacmi de biyolojik yarı ömrünü değiştirir. Ayrıca dağılım hacmi ilacın vücut klirensini de etkiler. Bazı fizyolojik olaylardaki değişiklikler. Örneğin böbrek fonksiyon yetmezliğinde ilacın klirensi yavaşlar ve biyolojik yarı ömrü uzar ya da vücut sıvı dengesi değiştiğinde dağılım hacmi değişir. Tür, yaş, cinsiyet, beslenme durumu, vücudun yağ oranı, plazma proteinlerine bağlanmanın boyutu ve vücutta başka ilaçların ya da gıda katkı maddelerinin varlığı, klirens, biyolojik yarı ömür ve dağılım hacmi gibi kinetik parametreleri önemli ölçüde değiştirir. İlacın formülasyonu (enjektabl, uzun ya da kısa etkili oluşu) ve uygulama yolu biyoyararlanımı etkiler. Sonuçta enjektabl ilaçlar yeme ve suya katılarak verilen ya da bolus şeklinde uygulanan ilaçlardan, uzun etkili (LA) formundaki ilaçlar da diğer enjektabl ilaçlardan daha sık kalıntı riski oluşturmaktadırlar (34).

Kesim öncesi bekletme süresini hastalık durumu da etkiler. Doku hasarı, inflamasyon ve patojen mikroorganizma invazyonu sistemik değişimleri artırır ve bu durum "akut faz cevabı" olarak bilinir. Bu değişimler arasında iştahsızlık, gastrik fonksiyon bozukluğu, karaciğer akut faz proteinlerinin sentezindeki, sitokrom P 450 enzimindeki ve karaciğer, böbrek gibi çeşitli organlardaki kan akımındaki değişiklikler sayılabilir. Akut faz cevabının başlaması hormon benzeri polipeptitlerin yani sitokinlerin (tümör nekroz faktör, interferonlar) üretim ve salınmalarına neden oluyor ve bu maddeler de sitokrom p 450 enzimlerin *in vivo* baskılanmasına ve sonuçta ilacın metabolizmasının değişmesine neden olabilmektedir. Sonuçta hastalık durumunda ilacın farmakokinetiği değişebilmekte ve kesim öncesi bekletme süresi de değişmektedir. Genel bir ifadeyle, bir ilaç ya da kimyasal maddenin biyolojik yarı ömrünün yaklaşık 10 katı sürede vücuttan %99,9'unun atıldığı kabul edilmektedir. Hastalık durumunda bu süre iki katına çıkabilir ve yasal arınma süresi de, bu duruma uygun olarak iki katına ayarlanmalıdır. İlacın dozu ve doz aralığı da etkileyen önemli faktörlerdendir. İlacın dozu bir kat artırılarak uygulandığında yasal arınma süresine bir biyolojik yarı ömür süresi eklenerek yeni yasal arınma süresi belirlenir (1,19,38). Sütlerde kalıntı olması durumunda da yasal olarak sütün tüketilmeme süreleri belirlenmiştir. İlaçların süte geçişinde ilacın pH'sı ve lipofilitesi oldukça önemlidir. Örneğin; eritromisin gibi bazik ilaçlar penisilin gibi asidik ilaçlardan daha uzun süre arınma süresi gerektirmektedirler (pH dağılım hipotezine göre zayıf bazik ilaçlar zayıf asidik olanlardan daha iyi süte geçerler). Benzer şekilde lipofilik ilaçların da süttten atılma süresi uzundur. Hayvanın sağımında ya da kuru dönemde olması da önemlidir çünkü uzun etkili ilaçlar (LA) çoğunlukla kuru dönemde kullanılmaktadır ve bu ilaçlar kullanıldığında yasal arınma süresi uzamaktadır (1).

Kalıntılarının zararları

Kalıntılarının çoğunluğunu veteriner sahada kullanılan antibiyotikler oluşturmakta ve bunlardan başta penisilinler olmak üzere insanlarda hafif dereceden anafilaksiye kadar değişebilecek şiddette ilaç alerjisi oluşturabilir. Ekonomik kayıplara neden olabilir. Başta penisilin kalıntıları olmak üzere gıdalardaki pek çok antibakteriyel ilaç kalıntıları ham gıda maddelerinden fermente ederek ürün haline getirme aşamasında fermente etmek için kullanılan starter kültürleri etkileyerek, peynir, yoğurt ve sucuk v.b. ürünlerin

hazırlanmasında üretim hataları oluşturabilirler. Bazı hastalıkların teşhisi yanlış değerlendirilebilir. Örneğin Salmonella gibi patojen etkenler ette mevcut oldukları halde tespit edilememeleri gibi. Mikroorganizmalarda, direnç oluşturabilir. Sindirim sistemi mikroflorasında değişiklikler, insanlarda cinsiyet ve üreme bozuklukları oluşturabilir. Karsinojenik etki meydana getirebilirler. Örneğin, kloramfenikol kemik iliği ve kan hücrelerini etkileyerek ölümlere neden olmakta ve Food Drug Administration (FDA) tarafından gıda üretiminde kullanılan hayvanlarda yasaklanmış ve ülkemizde bu yasağa 1994'den beri uygulamaktadır. FDA tarafından nitrofuranlarda kanserojen olmalarından dolayı gıda üretiminde kullanılan hayvanlarda yasaklanmıştır (1,19,38).

Kalıntı analiz metotları

Bu metotlar kalıntı tarama ve doğrulama olarak ikiye ayrılır. Tarama metotları kolay, ucuz, kısa zamanda yapılabilen, hassasiyet ve spesifikliği (yanlış ölçülen pozitif örnek sayısının minimum olması) ve tekrarlanabilirliği yüksek olmalıdır (17,25,33).

1.Tarama (monitoring ya da screening) metotları

İmmunolojik metotlar

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

(ELISA): Hayvansal ürünlerde kimyasal kalıntıların çok sayıda olması ve gıda türlerinin de farklılık arzemesi nedeniyle etkin bir kalıntı izlenmesi yapılabilmesi için tarama analizlerinin kullanımı zorunludur. ELISA yöntemi bu alanda en yaygın kullanılan uygulamadır (32). Bu yöntemde hedef moleküle spesifik geliştirilmiş antikorların kullanılması spesifikite ve hassasiyeti artırmaktadır. Spesifitesi nedeniyle hem güvenilirliği yüksek, hem de kolaydır. Dolayısıyla kısa zamanda çok sayıda numunenin farklı ilaç kalıntıları için analizi mümkün olmaktadır. Ancak test kit ömrünün kısalığı ve antikorların diğer maddelerle çapraz reaksiyona girebilmesi ve maliyetinin fazlalığı ise dezavantajlarıdır. Antijen antikor birleşmesi esasına dayanan bu yöntemde genel olarak 12X8=96 adet kuyucuktan oluşan pleytten oluşur. ELISA yönteminin prensibi, spesifik antijen-antikor reaksiyonuna dayanır. Bu teknikte işaretli antijen veya antikor tayini yapılır. İşaretli konjugatın hazırlanmasında işaretleyici olarak enzim kullanılır. Deneyde numuneler genelde ekstraksiyon işlemlerinden geçirilerek kuyucuklara eklenir. Numunedeki antijenler nonspesifik olarak kuyucuklara bağlanır. Üzerine işaretli antikor eklenir ve belirli bir süre inkübe edilerek yıkama yapılır. Yıkama ile bağlan-

mamış işaretli antikorlar uzaklaştırılır. Daha sonra ortama enzimin substratı ilave edilerek enzim işaretli antikor miktarı enzim aktivitesinin dalga boyuna karşılık okunması ile hesaplanır (33).

Radyoimmunoassay (RIA): RIA, immüno-kimyasal reaksiyonlarda radyoaktif atomlar yardımıyla maddelerin miktar tayinlerinin yapıldığı bir metottur. Bu metodun ana bileşenleri; analiz edilecek ilaç ya da kalıntısı aranan maddenin uygun bir radyoizotopla işaretlenmiş standartları ve bu ilaç ya da maddeye karşı önceden hazırlanmış antikor ihtiva eden anti serumdur. Metotta, bir tüpe kalıntı aranacak serum, idrar vb. numune, belirli miktarlarda antikor ve radyoaktif ile işaretlenmiş standart konur. Böylece, radyoaktif ile işaretli ve işaretlenmemiş ilaç ya da kalıntı maddeleri aynı antikor için yarışarak bağlanmaya çalışırlar. İşaretlenmemiş madde miktarı ne kadar fazlaysa, o kadar az işaretlenmiş madde antikorla birleşir. Böylece, radyoaktif ile işaretlenmiş bağlı madde miktarı işaretlenmemiş madde miktarı ile ters orantılıdır. Karışımdaki reaksiyon dengeye ulaştığında, ayırım prosedürü gerçekleştirilir. Bu tekniğin esası; kalıntısı aranan ilaç ya da diğer maddelerin konsantrasyonu, antikora bağlı, işaretli kalıntının ya da serbest haldeki kalıntının radyoaktivitesinin belirlenmesine dayanır (33, 37).

Multiarray biosensors: Biosensörler gıda maddelerinin analizlerinde gittikçe yaygınlaşmaktadır. Analiz edilecek madde (antibody) ile biyokimyasal etkileşim oluşturarak bir sinyal açığa çıkarır. Bu sinyal bir dönüştürücü vasıtasıyla elektronik bir sinyale dönüştürülür ve bunlar mikro işlemci tarafından işlenerek sonuç olarak ifade edilir. Bir numune (kan, doku, idrar vb) içindeki bir den çok madde kalıntısını eş zamanlı olarak belirlenebilir (33,39).

Kromatografik teknikler

Bu teknik, bir karışımdaki farklı özelliklere sahip maddelerin (polarite, çözünürlük, affinite, iyonik güç ve çap farklılıklarına bağlı olarak) ayrılarak hareketli (mobil) bir faz yardımı ile sabit bir faz üzerinden geçirilerek ve geçiş hızlarına bağlı olarak belirlenmesidir (10,33).

Kromatografi tekniğinin temelinde temel unsurlar, sabit faz: (katı ya da katı destek üstüne emdirilmiş bir sıvı tabakadan oluşur) ve hareketli fazdır(sıvı ya da gazdır) (10).

High performance thin layer chromatography (HPTLC): Bilinen en eski ince tabaka kromatografisi (İTK) yönteminin sınırlı sayıda maddeyi analiz edebilmesi ve kolayca kullanıcı

hatalarına sebep olmasından dolayı, Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (YPİTK ya da HPTLC), İTK'yi esas alarak geliştirilmiş ve nicel analiz yapabilen basit yarı otomatik analitik bir cihazdır. HPTLC tekniği tek bir bilgisayar sistemi tarafından kontrol edilen farklı işlemlere sahip cihazlardan oluşur. Bu cihazlardan birincisi robotik bir enjektör sistemine sahiptir ve bu sistem sırasıyla yerleştirilen küçük şişeciklerdeki (vialler) örnekleri belirlenen miktarlarda ve mesafelerde adsorban ile kaplanmış plakaya azot gazı altında bant ya da spot tarzında tatbik eder. İkincisinde, bu plaka geliştirme tankına ayırım işlemi için bırakılır. Bu tanklar izokratik ve gradiyent olarak iki farklı türde yapılmıştır. İzokratik tank hazneye bırakılan plakayı otomatik bir şekilde tanka taşır ve belirlenen hareketli (mobil) fazın plaka üzerinde ilerlemesini sağlar. Sonra plaka tanktan çıkarılarak kurutma sisteminde kurutulur. Plaka üzerinde lekeler meydana gelir. Üçüncü sistemde ise bu lekelerin tarayıcı sistemde dansitometrik değerlendirilmesi yapılır. Plakadaki lekelerin başlangıçta numune uygulanan noktaya mesafesinden maddenin alıkonma süresi (Rf değeri) yani maddenin isimlendirilmesi yapılır. Plakadaki bu lekeler üzerine gönderilen ışığın şiddetinden yansıyan ışığın şiddeti çıkarılarak kalıntısı belirlenecek maddenin miktarı dansitometrik olarak belirlenir (36).

Yüksek Performanslı Likit Kromatografi (HPLC): Aşağıda (doğrulama metotlarında) bahsedilmiştir.

Nükleer manyetik rezonans (NMR):

NMR, atom çekirdeklerinin manyetik özelliklerine bağlı fiziksel bir olgudur. NMR spektroskopisi bir molekül hakkında fiziksel, kimyasal ve yapısal bilgi edinmek için kullanılan başlıca tekniklerden biridir. Biyolojik moleküllerin çözelti içinde üç boyutlu yapıları hakkında ayrıntılı bilgi veren tek yöntemdir (28). Bazı veteriner ilaçlar ve steroid yapılı maddeler için önerilmektedir (33). Yöntemin esası, çekirdeğin manyetik özelliğine dayanmaktadır. Bu yöntemde ışın enerjisi çekirdek tarafından absorbe edilir. Radyo frekans vericisi tarafından oluşturulan değişken alan analiz yapılacak madde üzerine gönderilir. Enerjinin absorbe edilebilmesi için radyo frekans vericisinin meydana getirdiği değişken alanın frekansı rezonans şartlarını sağlaması gerekir. Sonuçta radyo frekans alıcısı kaybolan enerjiyi ölçerek sinyal kaydedici vasıtasıyla belirlir (28).

2. Kalıntı doğrulama metotları

ELISA testi ile pozitif olarak belirlenen sonuçların, kromatografik (gaz, sıvı vb) ve kütle spektrofotometrik yöntemlerle gelişmiş laboratuvar ekipmanlarının (HPLC, GC-MS, LC-MS ve LC/MS/MS gibi) kullanıldığı, pahalı ve zahmetli ekstraksiyon aşamaları gerektiren ama daha kesin sonuçlar veren metodlarla doğrulanması gerekir (32,33).

Yüksek Performanslı Likit Kromatografi (HPLC):

Bu kromatografide polariteleri birbirinden farklı sıvı bir mobil (hareketli) faz ve dolgu maddesinden oluşan sabit bir faz vardır. Çoğunlukla mobil faz apolar (hegzan gibi) ve sabit fazda polar (etilen glikol gibi) bir sıvı maddedir. Bunun tersi maddeler kullanılırsa buna ters faz (reverse) sıvı-sıvı kromatografisi denir. Kolon çıkışında maddenin derişimi, bir dedektörle ölçülür. Dedektör tipleri olarak UV (ultraviyole), DAD (diodoarray dedektör) ve floresans olarak adlandırılır. Son zamanlarda kütle spektrofotometresi (mass-spekto, MS) de kullanılmaktadır (27,32).

Sıvı Kromatografisi-Kütle-Kütle spektrofotometrisi (LC-MS ya da LC-MS-MS):

LC-MS/LC-MS-MS spektrometresi tekniğinde; HPLC ile fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılan örnek moleküller kütle dedektörü ile belirlenir (16). Normalde yüklü olmayan moleküller kütle spektrometreleri iyonizasyon işlemi ile uyarılarak yüklü iyonize moleküller haline çevrilirler. Kütle spektrometreleri (MS), manyetik ya da elektriksel bir alandan geçen yüklü partiküllerin birbirinden kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılmaları esasına dayanır (4,29). LC-MS/MS'in iki avantajı vardır. Bunlardan birincisi çok düşük konsantrasyonlarda maddenin miktar tayininin yapılabilmesi ve diğeri de sonuçların doğrulanmasına da gerek kalmamasıdır (26,32,33).

Gaz kromatografisi/kütle spektroskopisi (GC-MS):

GC-MS, gaz kromatografisi ve kütle spektroskopisinin birlikte kullanımı olup, GC karışımdaki bileşenleri ayırır, MS ise her bir bileşenin yapısal olarak tanımlanmasını sağlar. GC-MS sistemi çok küçük miktarlardaki çok bileşenli ve gaz fazında ya da gazlaştırılabilen maddelerin belirlenmesi, doğru ve hızlı analiz edilmesi gibi önemli avantajları bulunmaktadır. Kromatografide maddeler ayrıldıktan sonra iyonlaştırılarak kütle spektrometrede maddeler

kütlelerine bağlı olarak belirlenir (32,37).

Yukarıda açıklanan metotlar dışında, ağır metallerle kirlenmelerde kalıntı analizlerinde ise *atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS)* ve *İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma-Kütle Spektrometresi (ICP-MS)* teknikleri kullanılmaktadır. ASS, yüksek sıcaklıkta gaz halinde bulunan element atomlarının elektromagnetik ışınları absorblaması üzerine kurulmuştur. Absorblanan elektromagnetik ışınlar genellikle ultraviyole ve görünür alan ışınlarıdır (37). ICP-MS: Analiz edilmek istenen örnekteki elementler ICP'de elektromanyetik indüksiyonla belli bir sıcaklığa ulaştırılan argon plazması tarafından iyonlaştırıldıktan sonra kütle spektroskopisine gönderilerek ve burada kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrıştırılıp bir dedektör tarafından ölçülürler. Bu teknik, katı ve sıvı örneklerde çok sayıda elementin hızlı, ucuz, hassas ve doğru biçimde, niteliksel, niceliksel ya da yarı-niceliksel olarak ölçülmesine olanak sağlayan ileri teknoloji ürünü bir analiz tekniğidir (6,14,32).

Sonuç ve Öneriler

Kalıntı sorununun esasını, veteriner ilaçları, ağır metaller, çevresel kirlenmeler, pestisit ve mikotoksinler oluşturmaktadır. Bu sorununun çözülebilmesi için veterinerler, hayvan sahipleri, bakanlık, bilim insanları ve ilaç sektörü başta olmak üzere kalıntı konusunu önemli bir problem olarak görmeli bu konuyla ilgili yeterli bilgiye sahip olmalıdırlar. Kalıntıların tüketici sağlığı yönüyle risk değerlendirilmesi yapılırken, kesim öncesi bekleme süresine mutlaka uyulmalı, KGA, MRL düzeyleri dikkate alınmalı ve yukarıda açıklanan pek çok faktörün bu süreyi etkileyebileceği daima düşünülmelidir. Analiz sonuçlarında hem ana madde hem de metabolitleri açığa çıkıyorsa, kalıntı miktarı toplam kalıntı olarak hesaplanmalıdır. Mezbahaneler başta olmak üzere hızlı test izleme teknolojileri (tarama testleri) kullanarak kalıntı kontrolü yapılmalıdır. Etiket dışı ilaç kullanılmamalı ve o hayvan türü için doz, doz aralığı ve müstahzarı onaylanmış ilaçlar seçilmelidir. Kullanılan ilaçlar kayıt altına alınmalıdır. Tarama metotları kullanılarak analiz yapılacak örnek sayısı artırılmalıdır.

Kaynaklar

1. Adams RH, Riviere J. Chemical residues in tissues of food animals. Adams RH ed. In: Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Eighth Edition. Iowa: Iowa State Press, 2001; pp. 1166-74.

2. Akkaya R, Akıllı A, Gürel Y, Çınar S, Koç F, Turhan E, Daş YK, Yiğit Y, Başsatan A. Türkiye'de yetiştirilen etlik piliçlerin et ve diğer organlarının anabolik hormonlar, beta-agonistler ve pestisitler ile kirlenme durumunun incelenmesi. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg* 2004; 15(1-2): 37-48.
3. Akkaya R, Gürel Y, Koç F, Yiğit Y, Daş YK, Başsatan A, Karakurt İ. Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'ne 2001-2002 yılları arasında gönderilen örneklerde tespit edilen pestisitlerle zehirlenme vakaları. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg* 2005; 16(1-2): 37-42.
4. Andersen BD, Wise BL. *Textbook of clinical chemistry*. Philadelphia: WB Saunders Company, 1986; pp. 197-208.
5. Aydın A, Aksu YF. Gıdalarda veteriner ilaç kalıntıları. *Türkiye Klinikleri J Food Hyg Technol-Special Topics* 2015; 1(1): 1-9.
6. Batsala M, Chandu B, Sakala B, Nama S, Domatoti S. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *IJRPC* 2012; 2(3): 671-80.
7. Boobis A, Cerniglia C, Chicoine A, Fattori V, Lipp M, Reuss R, Verger P, Tritscher A. Characterizing chronic and acute health risks of residues of veterinary drugs in food: latest methodological developments by the joint FAO/WHO expert committee on food additives. *Crit Rev Toxicol* 2017; 10: 1-15.
8. Canlı Hayvanlar ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler ile Bunların Kalıntılarının İzlenmesi İçin Alınacak Önlemlere Dair Yönetmelik; 17.12.2011 tarih ve 28185 sayılı Resmi Gazete. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111217-4.htm>. Erişim tarihi: 18.03.2017.
9. Cerniglia CE, Kotarski S. Evaluation of veterinary drug residues in food for their potential to affect human intestinal microflora. *Regul Toxicol Pharm* 1999; 29(3): 238-61.
10. Coskun O. Separation techniques: Chromatography. *North Clin Istanbul* 2016; 3(2): 156-60.
11. Council Regulation EEC 2377/90 of 26 June 1990 Laying Down a Community Procedure For the Establishment of Maximum Residue Limits of Veterinary Medicinal Products in Foodstuffs of Animal Origin. http://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-5/reg_1990_2377/reg_1990_2377_en.pdf. Erişim tarihi: 07.03.2017.
12. FAO/WHO. *Updating the Principles and Methods of Risk Assessment: MRLs for Pesticides and Veterinary Drugs*. Rome, 2006. ftp://ftp.fao.org/ag/agn/jecfa/bilthoven_2005.pdf. Erişim tarihi: 07.03.2017.
13. Fink-Gremmels J, van Miert ASJPAM. Veterinary drugs: disposition, biotransformation and risk evaluation. *Analyst* 1994; 119 (12): 2521-8.
14. Greenfield S. Inductively coupled plasmas in atomic fluorescence spectrometry. A review. *J Anal At Spectrom* 1994; 9(5): 565-92.
15. Gürel Y, Akkaya R, Yiğit Y, Koç F, Daş YK, Başsatan Yorulmaz A, Kahveci İ. Türkiye'deki tavuk yumurtalarının organik klorlu pestisit ve poliklorlu bifenil bileşik kalıntı düzeylerinin araştırılması. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg* 2008; 19(1): 13-8.
16. Hernandez F, Sancho JV, Pozo OJ. Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples. *Anal Bioanal Chem* 2005; 382(4): 934-46.
17. Ishraga GI, Amna EK, Yarsan E, Altintas L, Tumer I. Methods for screening veterinary drug residues in animal products: A review. *Sudan J Vet Res* 2016; 31: 1-9.
18. Kaya S, Bilgili A. Zehirlenme ve zehirlilik denemeleri. Kaya S, Piringçi İ, Bilgili A. eds. In: *Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji*. İkinci Baskı. Ankara: Medisan Yayınları, 2002; ss. 21-32.
19. Kaya S. Gıdalarda veteriner hekimliği ilaçları ile ilgili kalıntı sorunu. Birinci Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi. Eylül, 22-24, 2005; Ankara-Türkiye.
20. Koc F. The screening of quinolone residues in animal tissues using HPLC. *Indian Vet J* 2006; 83(10): 1063-4.
21. Koc F, Gürel Y, Yiğit Y, Atamanalp M, Das YK, Kısa F. Screening cage culture fish species in Turkey for some organic chlorinated pesticide and polychlorinated biphenyl residues. *Isr J Aquacult-Bamid* 2008; 60(4): 253-60.
22. Koc F, Karakus E. Determination of organochlorinated pesticide residues by gas chromatography - mass spectrometry after elution in a florisil column. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2011; 17(1): 65-70.
23. Koc F, Yiğit Y, Das YK, Gürel Y, Yaralı C.

- Determination of aldicarb, propoxur, carbofuran, carbaryl and methiocarb residues in honey by HPLC with post-column derivatization and fluorescence detection after elution from a florisil column. *J Food Drug Anal* 2008; 16(3): 39-45.
24. Koç F, Kısa F. Dioxinler. *Etlük Vet Mikrobiyol Derg* 2005; 16(1-2): 57-62.
 25. Mainero Rocca L, Gentili A, Perez Fernandez V, Tomai P. Veterinary drugs residues: a review of the latest analytical research on sample preparation and LC-MS based methods. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2017; 34(5): 766-84.
 26. Masia A, Suarez-Varela MM, Llopis-Gonzalez A, Pico Y. Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry: A review. *Anal Chim Acta* 2016; 936: 40-61.
 27. Nollet LML, Toldra F, eds. *Food Analysis by HPLC*. Third Edition. Florida: CRC Press, 2012; pp. 567-716.
 28. Pellecchia M, Sem DS, Wüthrich K. NMR in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1(3): 211-9.
 29. Petrovic M, Hernando MD, Diaz-Cruz MS. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples. *J Chromatog A* 2005; 1067(1-2): 1-14.
 30. Principles and methods for risk assesment of chemical in food. Chapter 8: Maximum residue limits for pesticides and veterinary drugs. FAO/WHO 2009. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44065/11/WHO_EHC_240_11_eng_Chapter8.pdf?ua=. Erişim tarihi: 07.03.2017.
 31. Report of a FAO/WHO Conculatation. Guidelines for predicting dietary intake of pesticides residues (revised). Programme of Food Safety and Food Aid. Geneva, Switzerland 10-14 Feb 1997. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/63988/1/WHO_FSF_FOS_97.5.pdf. Erişim tarihi: 07.03.2017.
 32. Senyuva HZ. Analytical methods (Overview of methods of analysis for chemicals hazardous). Motarjemi Y, Toy G, Todd E, eds. In: *Encyclopedia of Food Safety*. Fifth Edition. San Diego, CA: Elsevier, 2014; pp. 152-8.
 33. Toldra F, Milagro R. Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. *Trends Food Sci Technol* 2006; 17(9): 482-9.
 34. Traş B, Elmas M. *Klinik Farmakokinetik*. Birinci Baskı. Konya: Selçuk Üniversitesi Basımevi 2005; ss. 40-125.
 35. Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Kökenli Gıdalarda Veteriner İlaçları Maksimum Kalıntı Limitleri 2002/30 sayılı Tebliği; 28.04.2002 tarih ve 24739 sayılı Resmî Gazete. http://www.ihsm.gov.tr/indir/mevzuat/tebligler/T_28042002_1.pdf. Erişim tarihi: 21.03.2017.
 36. Türkmen Z, Mercan S, Cengiz S. Eroin, morfin, kokain ve metilendioksiamfetamin (mdma)'in yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi ile eş zamanlı tayini. *Adli Tıp Dergisi* 2008; 22(1): 13-24.
 37. Vural N. *Toksikoloji Laboratuvar Kitabı*. Birinci Baskı. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi, 2000; ss. 70-4.
 38. Yarsan E. Hayvansal gıdalarda kalıntı sorunu. *Vet Farm Toks Dern Bült* 2012; 6: 3-6.
 39. D Wu, D Du, Y Lin. Recent progress on nanomaterial-based biosensors for veterinary drug residues in animal-derived food. *Trends Analyt Chem, Part B* 2016; 83: 95-101.

Sorumlu Yazar:

Prof. Dr. Feride KOÇ
 Erciyes Üniversitesi,
 Veteriner Fakültesi,
 Farmakoloji ve Toksikoloji ABD,
 Kayseri-TÜRKİYE
 Tel:035233986323
 Fax:03523372740
 E-posta: feridekoc@yahoo.com



A Case of Atresia Ani in an Anatolian Water Buffalo Calf*

Kemal VAROL¹, Gültekin ATALAN³, Vehbi GÜNES², Umut ALPMAN³, Muhammed Kaan YÖNEZ³

¹ Mehmet Akif Ersoy University, Department of Veterinary, Food, Agriculture and Livestock Vocational College of Burdur, Burdur-TURKEY

²Erciyes University, Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Kayseri-TURKEY

³ Erciyes University, Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Kayseri-TURKEY

Summary: In this case report; an Anatolian water buffalo calf with defecating problem since birth, was referred to the our clinic, was evaluated. Clinically no anal opening of anus was visible. There was a soft swelling under anal region which suggested us the case to be atresia ani. The animal was prepared for surgery. Following anaesthesia plus (+) shape like incision was made over the anal region, skin retracted. Greyish colour of rectum end was seen in two cm inside of the skin. Rectum was withdrawn towards anal skin and fixed. After fixation, rectal end was perforated and meconium coming up to was observed. This case, atresia ani alone was reported first time in an Anatolian water buffalo calf with case report in Turkey.

Key words: Atresia ani, congenital defect, water buffalo calf

Bir Anadolu Manda Buzağısında Atrezia Ani Olgusu

Özet: Olgu doğduğu günden itibaren dışkı yapamama şikâyeti ile kliniğimize gelen bir Anadolu manda buzağısında değerlendirildi. Klinik olarak anüsün anal açıklığının olmadığı görüldü. Anüse yapılan palpasyonda, kapalı anüs derisinin altında içerisinde mekonyum dolu rektum palpe edildi ve atresia ani teşhisi konuldu. Hayvan ameliyat için hazırlandı. Anesteziyi takiben anal bölge üzerinde bir artı (+) şeklinde insizyon yapıldı ve deri geri çekildi. Rektum ucunun grimsi rengi cildin iki cm içerisinde görüldü. Rektum anal deriye doğru çekildi ve anal bölgeye sabitlendi. Fiksasyondan sonra rektal uç delindi ve mekonyum çıkışı görüldü. Bu olgu Türkiye’de bir malakta bildirilen ilk vaka raporudur.

Anahtar kelimeler: Atresia ani, konjenital defekt, manda buzağısı.

Introduction

Congenital defects are the functional anomalies that present in birth. Genetic or environmental factors alone or together cause these defects. In many occasions, reasons behind this are not known. The most widespread environmental teratogens for cattle are; eating toxic plant by mother cow, viral infections during pregnancy and maternal-fetal viral infections (6,13). Atresia ani is a congenital anomaly reported in all domestic animals which characterized with anal opening closure and end up with blind pouch under the skin (6,18,27).

Clinically observed findings are, the absence of feces, dullness, anorexia, abdominal strain, discomfort and tension associated with defecation attempt (2,6). In domestic animals, to correct atresia ani, various surgical techniques have been suggested (14,28). In surgical techniques;

+ like incision and circular incision are the most common used surgical methods. But, stenosis like complication has been reported to developed in above techniques (1,3,23).

In this case report, the presence of atresia ani in an Anatolian water buffalo was described which is seen rarely and applied surgical method were also presented.

Case Report

The animal was referred to University of Erciyes, Faculty of Veterinary Medicine Clinics for defecating problem since birth. Body temperature, respiratory and pulse frequency were as 37.8°C, 24/min and 124/min respectively. Clinically no anal opening was visible (Figure 1A). There was a soft swelling under anal region which suggested us the case to be atresia ani (Figure 1B and Figure 2A). Therefore, the animal was prepared for surgery. Before the operation 8 mL of blood were taken from the vena jugularis of the animals to tubes containing K₃EDTA. Whole blood count were made using Mindray BC 2800 Vet (Table 1). Blood gas

Geliş Tarihi/Submission Date : 11.04.2017
Kabul Tarihi/Accepted Date : 27.02.2018

*This case presentation was presented as a poster in International Conference on Biological Sciences, Konya, Turkey, 21-23 October 2016.

Table 1. Haematological findings in the Anatolian water buffalo calf with atresia ani

Parameters	Findings	References Mean \pm SD (8)
WBC($10^9/l$)	65.5	11.08 \pm 1.12
RBC ($10^{12}/l$)	9.05	9.53 \pm 0.71
HGB(g/dl)	13.4	12.77 \pm 1.00
HCT(%)	42.7	41.49 \pm 4.10
MCV(fl)	47.2	43.43 \pm 1.90
MCH(pg)	14.8	13.39 \pm 0.23
MCHC (g/dl)	31.3	30.80 \pm 1.14
RDW (%)	15.9	21.10 \pm 0.97
PLT ($10^9/l$)	756	259.86 \pm 73.67
MPV	4.5	10.67 \pm 1.23
PDW	16.5	41.01 \pm 1.07
PCT	0.340	0.28 \pm 0.08

WBC: White blood cells; RBC: Red blood cells; HGB: Haemoglobin; HCT : Hematocrit; MCV: Mean corpuscular volume; MCH: Mean corpuscular haemoglobin; MCHC; Mean corpuscular haemoglobin concentration; RDW: Red blood cell distribution width; PLT: Platelet; PCT Platelet crit; MPV: Mean platelet volume ; PDW: Platelet distribution width



Figure 1 A-B. Appearance of atresia ani, **A**; Clinical appearance of atresia ani, **B**; Swelling seen due to deposited meconium

analysis was also made by taking 3 mL blood using Irma true point blood gas analyser (Table 2). Following administration of 0.1 mg/kg xylazine-HcL IV, 10 mL of local infiltrative anaesthetic agent injected to the surgical area (Figure 2A). Plus (+) shape like incision was made over the anal region, skin retracted (Figure 2B). Subcutaneous tissues and the muscle encountered were separated bluntly. Greyish colour of rectum end was seen two cm inside of the skin (Figure 2C and Figure 2D). Rectum was withdrawn towards anal skin and fixed by interrupted suture to anal area using 1 USB number of polyglaction 910 (Figure 2E). After fixation, rectal end was perforated and meconium flowing observed (Figure 2F).

Discussion and Conclusion

Atresia ani; develops at the embryonic stage as a result of formation failure in cloacal plate dorsal pieces (6,10,18,27). In other words, a thin membrane covering normal anal canal does not disintegrate. Furthermore, cattle are more susceptible to chromosomal anomalies causing mutations at 14-42 days of embryonic age (15). Atresia ani is congenital and hereditary and is an autosomal recessive gene anomalies occurred at embryonic stage.

Environmental factors, plant toxins, and viral infections may also cause in the development of atresia ani. But in many cases, reasons behind development of anomaly is not clearly understood (4,22).

The animal was the first calf of the mother in the farm. No anomalies in mother sisters calves were also noted. There were no signs of feeding material causing any teratogenic effects. Newman et al. (19) have reported that rectal ultrasonographic examination made twice in per week, from the day of 28 to 90. Days of pregnancy may contribute to atresia ani development. In our case no rectal ultrasonographic examination was made till the end of pregnancy and therefore no possible relationship was detected with rectal examination and atresia ani development. The most frequently encountered intestinal anomaly is the atresia ani in ruminants. The anomaly occurs usually in urogenital and skeleton-muscle system.

Atresia ani and recti have been frequently reported in male lamp and female calves (20,21)

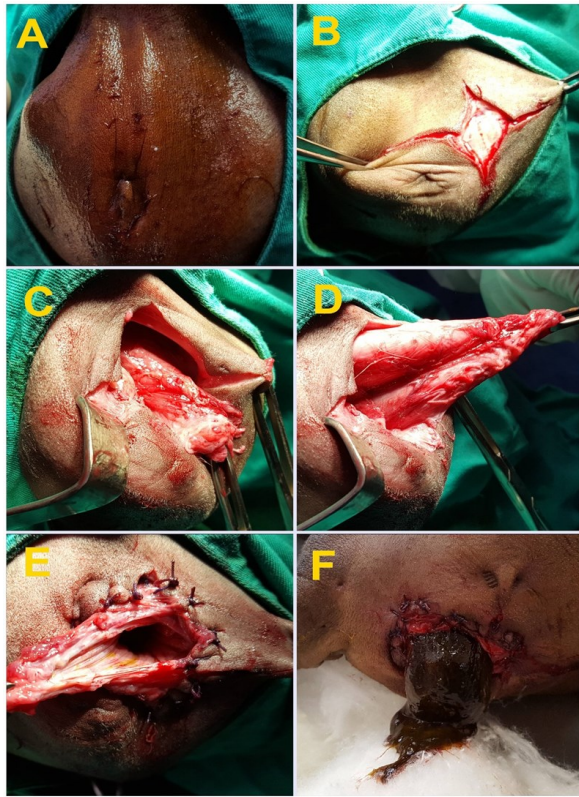


Figure 2 A-F. Appearance of atresia ani before and after treatment, **A**; Appearance before operation, **B**; Plus (+) shape like incision was made over the anal region; **C-D**; Greyish colour of rectum end was seen two cm inside of the skin **E**; Rectum was withdrawn towards anal skin and fixed by interrupted suture to anal area **F**; After fixation, rectal end was perforated and meconium flowing observed

Atresia ani in literatures has been classified as four types according to various degree of anus and rectum agenesi. In Type I, anus is open but narrows (anal stenosis), rectum develops normally. In type II, anus coats with a thin membrane. Rectum is located just in front of anal membrane as a blind sac. In type III, anus is not developed and rectum locates cranially as a blind sac. In type IV, terminal section of rectum and anus are normal but there is rectal atresia in pelvic canal (rectal agenesi) (17,24,25).

Atresia ani associated with rectovestibular fistula and vulvar agenesi together have been reported in water buffalo by Sreenu et al. (30) Moreover, Velavan et al. (32) have recorded a buffalo calf with atresia ani and recti. Krishna et al. (16) have also recorded vulva agenesi and terminal urethra with ani and recti in a buffalo calf.

In the present study, the buffalo calf had atresia ani and the rectum was as blind sac located in front of anal membrane which was in type II classification. The clinical signs of anorectal anomalies are associated with the duration of meconium retention (1). Anomalies should be treated surgically, otherwise death occurs due to disruption of physiological feeding and endotoxemic shock (1,16). Physiological leucocytosis may associate with stress, stimulation, fear or pregnancy in ruminants. Short term physiological leucocytosis may be seen after releasing of epinephrine.

The causes of pathological leucocytosis are

Table 2. Blood gas findings in the Anatolian water buffalo calf with atresia ani

Parameters	Findings	References Mean \pm SD (10,11,29)
pH	7.404	7.36 \pm 0.01
pCO ₂ (mmHg)	51.9	54.7 \pm 1.3
pO ₂ (mmHg)	29.0	37.0 \pm 1.2
Na ⁺ (mmol)	138.9	134.0 \pm 4.0
K ⁺ (mmol)	4.06	4.3 \pm 0.24
iCa (mmol)	1.43	2.85 \pm 0.07
HCO ₃ (mmol)	32.0	23.8 \pm 1.2
TCO ₂	33.6	32.5 \pm 0.83
BEb (mmol)	5.8	-1.10 \pm 0.10
BEecf (mmol)	7.3	NR
O ₂ Sat (+)	54.7	42.4 \pm 11.0

pH: Actual blood pH; pCO₂: Partial pressure of carbon dioxide; pO₂: Partial pressure of oxygen; Na⁺: Sodium; K⁺: Potassium; iCa: Ionized calcium; HCO₃: Bicarbonate; TCO₂: Total carbon dioxide; BEb: Standard base excess blood; BEecf: Base excess extrasellüler fluid; O₂Sat(+): Oxygen saturation; NR: Not Recorded

In contrary to these studies, the animal in our study was male.

infections, endogen and exogen intoxications, hormonal and central nervous disorders, ana-

phylactic shock, leukemia and cattle leucocytes adhesion (26). In parallel to these facts, white blood cells (WBC) ($65.5 \times 10^9/l$) values detected before surgery was high (Table I). The possible reasons of leucocytes might be attributed to stress, endotoxemia and inflammation due to lack of defecation.

Thrombocytosis may occur in ruminants as a result of splenic narrowing which induces by epinephrine. Essential or primer thrombocytosis is a condition of rare myeloproliferation. Cytokine releasing is triggered in reactive or secondary thrombocytosis and is seen in connection with stress, chronic blood loss, inflammation, neoplasia and iron deficiency (26).

In the lights of these informations, platelet (PLT) level in this study was found as $756 \times 10^9/l$. The possible reason in high PLT was considered due to inflammation associated with no defecation (Table I).

Furthermore, venous blood gas measurement of HCO_3^- , BEb and pH were 32.0 mmol, 5.8 mmol and 7.404 respectively which were higher than those of references values (Table II). The alternations of gas values were attributed to metabolic alkalosis arising from absence of defecation (31).

Surgical intervention in atresia cases should be initiated as early as possible. The place of constructed artificial anus is over the side of swelling area (12). The most common complications encountered postoperatively are functional insufficiency of anal sphincter or fecal incontinent depending on disruption of sphincter muscles during surgery (1,23). Moreover, some authors have suggested that a plus (+) shape of incision over the anus resulted in excessive tissue formation which induced anal stenosis (1,5). However, from 32 of cases with atresia that treated with an incision like +, only one animal had anal stenosis (12). Dreyfuss and Tulleners (7) used different techniques for anal reconstruction and they detected no signs of anal stenosis following circular incision. The anus was constructed by a plus shape of incision in the present study. Moderate degree of stenosis and little sign of straining in defecation were determined two months after surgery.

In conclusion, atresia ani was alone reported first time in an Anatolian Water Buffalo calf. The anal construction was made with a plus (+) shape of incision up to 2x2 cm in length. Moderate degree of anal stenosis was experienced in

the animal. Therefore, longer incision might result in less complication for the further interventions.

References

1. Aslan L, Karasu A, Gençcelep M, Bakir B, Alkan G. Ruminantlarda konjenital anorektal anomali olgularının değerlendirilmesi. YYÜ Vet Fak Derg 2009; 20(1): 31-6.
2. Atalan G, Özaydin G, Kiliç E, Cihan M., Kamgloglu A. Buzağılarda intestinal atresia olguları ve operatif sağaltımları (54 olgu). KAÜ Vet Fak Derg 2003; 9(1): 113-8.
3. Azizi S, Mohammadi R, Mohammadpour IN. Surgical repair and management of congenital intestinal atresia in 68 calves. Vet Surg 2010; 39(1): 115-20.
4. Bademkiran S, Icen H, Kurt D. Congenital recto vaginal fistula with atresia ani in a heifer: A case report. Van Vet J 2009; 20(1): 61-4.
5. Carraro DB, Dart AJ, Hudson NP, Dart CM, Hodgson DR. Surgical correction of anorectal atresia and rectovaginal fistula in an alpaca cria. Aust Vet J 1996; 74(5): 352-4.
6. Chauhan PM, Parmar VR, Patel TP, Parikh KTS. Atresia ani: A congenital defect and its successful management in non-descript calf. IJAVMS 2011; 5(6): 520-2.
7. Dreyfuss DJ, Tulleners EP. Intestinal atresia in calves: 22 cases (1978-1988). J Am Vet Med Assoc 1989; 195(4): 508-13.
8. Duhan J, Yadav P. Buffalo umbilical cord blood collection and hematological comparison with peripheral blood of new born calf and its dam. Indian J Anim Sci 2012; 82(8): 84-6.
9. Ghanem M, Yoshida C, Isobe N, Nakao T, Yamashiro H, Kubota H, Nakada K. Atresia ani with diphallus and separate scrota in a calf: A case report. Theriogenology 2004; 61(7): 1205-13.
10. Ghanem MM, El-Fkhrany SF, Abd El-Raof YM, El-Attar HM. Clinical and haemato biochemical evaluation of diarrhea neonatal buffalo calves (*Bubalus bubalis*) with reference to antioxidant changes BVMJ 2012; 23(2): 275-88.
11. Gökçe G, Gökçe Hİ, Erdoğan HM, Güneş V, Çitil M. Investigation of the coagulation profile in calves with neonatal diarrhoea. Turk J Vet Anim Sci 2006; 30(2): 223-7.
12. Göksel BA. Buzağılarda intestinal atresia'larda klinik ve operatif yaklaşımlar.

- Master thesis, Afyon Kocatepe Univ Sağ Bil Ens, 2015; p. 48-56.
13. Hussein RMN. Congenital anomalies in cattle and buffalo within Mudaina city in Basrah province between period 2007-2009. *Kufa J Vet Sci* 2010; 1(1): 207-18.
 14. Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N. *Pathology of Domestic Animals*. London: Academic press, 1993; pp. 1-900.
 15. Kamalakar G, Devaratnam J, Brahmaji R, Jyothsna B. Congenital atresia ani associated with recto-vaginal fistula in Ongole calf. *J Livest Sci* 2015; 6: 80-4.
 16. Krishna NVV, Hari P, Deri V, Raw CM. Agenesis of vulva and terminal urethra with atresia ani et recti in a buffalo calf. *Buffalo Bull* 2009; 28(4): 165-7.
 17. Loynachan AT, Jackson CB, Harrison LR. Complete diphallia, imperforate ani (type 2 atresia ani), and an accessory scrotum in a 5-day-old calf. *J Vet Diagn Invest* 2006; 18(4): 408-12.
 18. Monsang SW, Madhu DN, Sarode IP, Kumar R, Amarpal Pawde AM, Kinjavdekar P, Aithal HP. Surgical repair of a rare case of congenital recto - vaginal fistula and atresia ani in a crossbred piglet. *IJIAR* 2014; 2(8): 41- 4.
 19. Newman SJ, Bailey TL, Jones JC, Digrassie WA, Whittier WD. Multiple congenital anomalies in a calf. *J Vet Diagn Invest* 1999; (4): 368-71.
 20. Ođurtan Z, Alkan F, Koç Y. Ruminantlarda kongenital anomaliler, *Türk Vet Hek Derg* 1997; 9(4): 24-8.
 21. Öztürk S, Aksoy Ö, Kiliç E, Sözmen M, Aranci A. İki kuzuda ürogenital anomaliyle birlikte seyreden anüs ve rektum atrezisi. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg* 2005; 11(2): 171-4.
 22. Phaneendra MSSV, Lakshmi ND, Kumar KM, Reddy KS. Surgical management of congenital atresia ani (imperforate anus) leading to recto-vaginal fistula in a cow calf. *IJEST* 2015; 4(4): 1110-13.
 23. Prassinis NN, Papazoglou LG, Adamama-Moraitou KK, Galatos AD, Gouletsou P, Rallis TS. Congenital anorectal abnormalities in six dogs. *Vet Rec* 2003; 153(3): 81-5.
 24. Pratschke K. Surgical diseases of the colon and rectum in small animals. *In Pract* 2005; 27(7): 354-62.
 25. Purohit S, Jhirwal SK, Gahlot TK, Bishnoi P, Parashar M. Surgical management of recto-vaginal fistula with atresia ani in a lamb – a case report. *Vet Pract* 2004; 5(2): 102.
 26. Roland L, Drillich M, Iwersen M. Hematology as a diagnostic tool in bovine medicine. *J Vet Diagn Invest* 2014; 26(5): 592-8
 27. Shakoor A, Muhammad SA, Younus M, Kashif M. Surgical repair of congenital recto-vaginal fistula with atresia ani in a cow calf. *Pak Vet J* 2012; 32(2): 298-300.
 28. Singh AP. Congenital malformation in ruminants: A review of 123 cases. *Indian Vet J* 1989; 66(10): 981-5.
 29. Singh AK, Prabhakar S, Brar PS, Uppal SK, Singh P, Gandotra VK. Acid-base status and blood gas tensions of neonatal buffalo calves under normal and forced calving. *Indian J Anim Sci* 2011; 81(12): 1215.
 30. Sreenu M, Rao MM, Naidu KS, Rao TCS. Atresia ani associated with rectovestibular fistula and vulvar agenesis in a buffalo calf. *Buffalo Bull* 1998; 17(2): 41-2.
 31. Turgut K. *Veteriner Klinik Laboratuvar Teşhis*. Konya: Bahçivanlar Basım Sanayi AŞ, 2000; p. 90.
 32. Velavan A, Borena BM, Sharma R. Buffalo calf with multiple congenital abnormalities and management of atresia recti condition: A case report. *Intas Polivet* 2008; 9(1): 81-2.

Corresponding Author:

Asst. Prof. Dr. Kemal VAROL
 Mehmet Akif Ersoy University,
 Department of Veterinary,
 Food Agriculture and Livestock Vocational
 College of Burdur,
 Burdur-TURKEY
 E-mail: kmlvrl@yahoo.com



Kedilerde Cheyletiellosis ve Selamektin Damla ile Sağaltımı*

Umut Fikret KORKMAZ¹, Sami GÖKPINAR²

¹Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Kırıkkale-TÜRKİYE

²Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale-TÜRKİYE

Özet: *Cheyletiella* cinsine bağlı akarlar zoonoz karakterde olup, konaklar arasında yakın temas ile bulaşmaktadır. Konak spesifiteleri çok yüksek olmayıp, aynı etken farklı konaklarda enfestasyon yapabilir. Bu çalışmada iki adet sahipli ev kedisinde bulunan cheyletiellosis ve bunların selamektin damla ile sağaltımından bahsedilmiştir. Her iki olguda da hayvan sahipleri fazla miktarda kepeklenme ve kaşıntı şikayeti ile kliniğimize başvurmuştur. Kedilerin deri kazıntısının muayenesinde *Cheyletiella blakei* ile enfeste oldukları görülmüştür. Akar tespit edilen bu kedilere 15 gün arayla iki kez selamektin damla uygulanmıştır. Tedavi edilen bu hayvanların ikinci uygulamadan sonraki 15., 30. ve 60. günlerde yapılan muayenelerinde etkene rastlanmamıştır. Kedilerde iki doz selamektin damla ile mücadelenin cheyletiellosise etkili olduğu görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Cheyletiellosis, kedi, selamektin

Cheyletiellosis in Cats and Its Treatment with Selamectin Drop

Summary: *Cheyletiella* type mites are of a zoonotic character and spread by close contact between hosts. Host specificity is not high and may cause infection in a variety of hosts. In this study, cheyletiellosis infestation of two housecats and its treatment with selamectin drop has been mentioned. In both cases, the owners of the cats have presented their pets at our clinic with symptoms of itchiness and dandruff. Examination of skin scrapings of the cats were found to be infested with the *Cheyletiella blakei*. Following treatment with selamectin drop two weeks apart, after the second treatment, the agent of the infestation was not detected in the examinations made on the 15th, 30th and 60th days. Two doses of selamectin drop was effective against to cheyletiellosis infestations in cats.

Key words: Cat, cheyletiellosis, selamectin

Giriş

Cheyletiella cinsine bağlı akarlar zoonoz karakterde olup, konaklar arasında yakın temas ile bulaşmaktadır. Konak spesifiteleri çok yüksek olmayıp, aynı etken farklı konaklarda enfestasyon yapabilir. Bununla birlikte foretik olarak kedi ve köpek pireleri ile bir konaktan başka bir konaya taşınabilmektedir (10). Oldukça bulaşıcı olan etkenler kedi ve köpek yavruları arasında hızlı bir şekilde yayılabilme özelliğine sahiptirler. Uzun tüylü kedi ve köpeklerde daha sık görülen *Cheyletiella* sp. hayvanlarda orta veya şiddetli derecede kabuklu dermatitis ve kaşıntıya sebep olurlar. Lezyonlar enfeste hayvanların sırt, omuz ve boyun bölgelerinde daha fazla görülmektedir. Aynı zamanda zoonoz olan cheyletiellosis insanların enfeste hayvanla temas ettikleri bölgelerde eritemli, kaşıntılı ve bazıları nekrotik özellikte olan papüllere neden olur (9).

Selamektin, kedi ve köpeklerde hem oral hem

de topikal uygulamayı takiben yüksek bir etkinlik ve güvenlik kombinasyonuna sahip bir endektosittir (1,5). Aynı zamanda hayvanlar için antihelmintik aktivitesi ve dış parazitleri öldürücü aktivitesi kombine edilmiş ilk endektosittir (1).

Bu çalışmada iki adet sahipli ev kedisinde bulunan cheyletiellosis ve bunların selamektin damla ile sağaltımından bahsedilmiştir.

Olgular

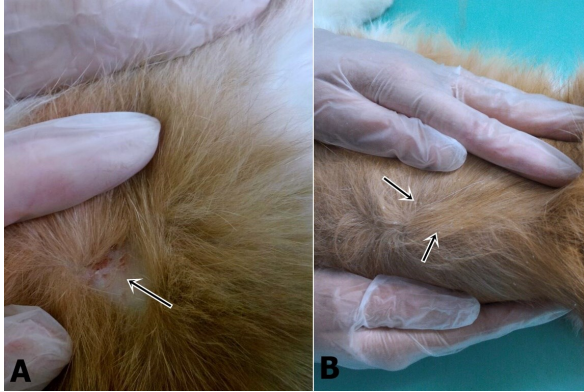
Çalışmanın materyalini iki yaşında, dişi, melez ve bir yaşında, erkek, melez olmak üzere iki kedi oluşturmuştur. Her iki olguda da hayvan sahipleri kedilerde fazla miktarda kepeklenme ve kaşıntı şikayeti ile kliniğimize başvurmuştur. Kedi sahiplerinin biri kendi vücudunda da lezyonlar ve kaşıntı olduğunu ve bunun için hastaneye başvurduğunu ifade etmiştir. Kedilerin yapılan muayenesinde tüy döküntülerinin az olduğu, ancak hayvanlarda şiddetli bir kaşıntı ve kepeklenme olduğu ve kaşıntıya bağlı olarak vücudun bazı bölgelerinde kabuklu yaraların bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 1).

Geliş Tarihi/Submission Date : 30.01.2018

Kabul Tarihi/Accepted Date : 18.05.2018

*Bu çalışma 2-4 Mayıs 2017 tarihleri arasında İstanbul'da düzenlenen 19. Uluslararası Veteriner Hekimliği Öğrencileri Bilimsel Araştırma Kongresi'nde poster bildirisi olarak sunulmuştur.

Lezyonlu bölgelerden bistüri ile kazıntı alınmış-



Şekil 1. Kedilerde cheyletiellosis A: Tüy dökülmesi B: Kepeklenme

tır. Alınan kazıntılar %10' luk potasyum hidroksit (KOH) ile muamele edilerek dokular eritilmiş ve etkenlerin açığa çıkması sağlanmıştır. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Yapılan muayenede her iki kedinin *Cheyletiella blakei* ile enfeste oldukları görülmüştür (Şekil 2).



Şekil 2. *Cheyletiella blakei* erişkin

Enfeste oldukları tespit edilen kedilere 15 gün arayla iki kez selamektin damla uygulaması yapılmıştır. İkinci uygulamadan itibaren 15., 30. ve 60. günlerde hayvanlardan deri kazıntısı örneği alınarak incelenmiştir. İkinci uygulamadan 15 gün sonra yapılan ilk muayenede hayvanlarda kepeklenmenin devam ettiği ve lezyon bölgesinde tüylerin çıkmadığı görülmüş, fakat etken tespit edilmemiştir. 30. günde yapılan muayenede hayvanlarda kepeklenmenin ortadan kalktığı ve bölgede tüylerin çıkmaya başladığı 60. günde ise hayvanlarda kaşıntı, kepeklenme ve lezyon-

ların bittiği, hayvanların tüyelerinin normale dönüğü tespit edilmiştir.

Tartışma ve Sonuç

Cheyletiellosis, özellikle erişkin hayvanlarda asemptomatik seyretmesi, hayvan sahiplerinde oluşan lezyonların başta pire ve uyuz enfestasyonları ile karıştırılması nedeniyle yaygınlığının bilinenden daha fazla olduğu düşünülmektedir (6).

Türkiye'de bugüne kadar kedi, köpek ve tavşanlarda *Cheyletiella* sp. akarlarına nadiren rastlanmıştır. Türkiye'de kedilerde ilk *Cheyletiella blakei* vakası Ankara'da dört aylık bir ev kedisinde (3) ve daha sonra İstanbul'da üç yaşında bir İran kedisinde bildirilmiştir (4). Bildirilen vakalar Kırıkkale' de tespit edilen ilk vakalardır.

Kedilerde cheyletiellosis sağaltımında bugüne kadar yapılan çalışmalarda, %2'lik neguvon ve enjektabl ivermektin kullanılmıştır. Bu çalışmalarda ivermektinin 400 mcg/kg dozda subkutan yolla bir veya iki kez uygulandığında başarılı sonuçlar alındığı bildirilmiştir (6). Ancak subkutan ivermektin tedavisinin kedilerde toksik olduğuna dair yayınlar da mevcuttur (7).

Chailleux ve Paradis (2) *Cheyletiella* sp. ile enfekte 15 kedinin her birine 0., 30. ve 60. günlerde olmak üzere üç defa 45 mg selamektini topikal uyguladıklarını ve 0., 30., 60. ve 120. günlerde hayvanların tekrar muayene edildiğini ifade etmişlerdir. Çalışmalarında 60. gün muayenesinden sonra etkene rastlamadıklarını, 15 kedinin tamamında bu zamana kadar klinik belirtilerin azaldığı ve bir yıl tekrarlamadığı ifade etmişlerdir. Bizim çalışmamızda hayvanlara 15 gün arayla sadece iki kez damla uygulama yapılmış ve ikinci uygulamadan 30 gün sonra hem klinik belirtilerin ortadan kalktığı, tüylerin normale dönüğü görülmüş hem de etkene rastlanmamıştır. Dolayısıyla kedilerde cheyletiellosise karşı iki defa yapılacak topikal selamektin uygulamasının yeterli olacağı ve fazla ilaç kullanımına bağlı olarak ileride ortaya çıkılabilecek ilaç direncinin önüne geçilmesi için bizim mücadele protokolümüzün daha uygun olacağı tarafımızdan düşünülmektedir.

Topikal selamektin uygulamasının kedilerde cheyletiellosis için etkili, pratik ve iyi tolere edilebilecek bir uygulama aracı olduğu bildirilmiştir (2). Bu çalışma ile topikal uygulamadan daha kolay olan damla yöntemi kullanılarak da etkin sonuç alınabildiği ortaya konmuştur.

Scarampella ve ark. (8) kedilerde cheyletiellosise karşı damla tarzında tek doz %10'luk fipronil

uygulamasından sonra yaptıkları muayenelerde akara rastlamadıklarını ve %100 başarı sağladıklarını bildirmişlerdir. Tek doz %10'luk fipronil uygulaması avantajlı bir durum olmakla birlikte sadece dış parazitlere karşı etkilidir. Çalışmamızda iki doz damla selamektinin uygulamasında cheyletiellosise karşı %100 sonuç alınmıştır. Selamektinin hem antihelmintik olarak hem de dış parazitlere karşı kullanılmakta olması nedeniyle fibronil ile tedaviden daha avantajlı olduğu tarafımızdan düşünülmektedir.

Sonuç olarak, özellikle yavru kedilerde enjektabl tarzda kullanılan ivermektin türevlerinde doz ayarlanmasının zor olması ve doz aşımına bağlı toksikasyon olaylarının çok görülmesi, kedilerde dış parazit mücadelesinde alternatif yollar aramaya sevk etmektedir. Bu nedenle damla şeklinde kullanılan ilaçlar kedilerde daha güvenli kullanıma sahiptir. Bu çalışmada selamektin damlanın 15 gün ara ile iki defa kullanımı ile kedilerde cheyletiellosis tedavisinde başarılı sonuç alındığı görülmüş, farklı bir tedavi seçeneği olarak tercih edilebileceği sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

1. Bishop BF, Bruce CI, Evans NA, Goudie AC, Gration KAF, Gibson SP, Pacey MS, Perry DA, Walshe NDA, Witty MJ. Selamectin: A novel broad-spectrum endectocide for dogs and cats. *Vet Parasitol* 2000; 91(2-3): 163-76.
2. Chailleux N, Paradis M. Efficacy of selamectin in the treatment of naturally acquired cheyletiellosis in cats. *Can Vet J* 2002; 43(10): 767-70.
3. Dinçer Ş, Karaer Z. Türkiye'de bir kedide ilk *Cheyletiella blakei* Smiley, 1970 (Acari: Cheyletiellidae) bulgusu. *Ankara Univ Vet Fak Derg* 1985; 32(2): 250-7.
4. Gülanber A. İstanbul'da bir kedide cheyletiellosis olgusu. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg* 2003; 29(1): 71-5.
5. Krautmann MJ, Novotny MJ, De Keulenaer K, Godin CS, Evans EI, McCall JW, Wang C, Rowan TG, Jernigan AD. Safety of selamectin in cats. *Vet Parasitol* 2000; 91(2-3): 393-403.
6. Kurtdede A, Alkan Z, İlhan T. Kedi cheyletiellosisinin ivermektin ile sağaltımı. *Ankara Univ Vet Fak Derg* 1994; 41(2): 275-9.
7. Lewis DT, Merchant SR, Neer TM. Ivermectin toxicosis in a kitten. *J Am Vet Med Assoc* 1994; 205(4): 584-6.
8. Scarpella F, Pollmeier M, Visser M, Boeckh A, Jeannin P. Efficacy of fipronil in the treatment of feline cheyletiellosis. *Vet Parasitol* 2005; 129(3-4): 333-9.
9. Turan H, Turan A, Çoban G, Gönen I. Cheyletiella dermatiti: Bir olgu sunumu. *Klimik Dergisi* 2012; 25(3): 127-9.
10. Ütük AE, Dumanlı N. Prostigmata. Karaer KZ, Dumanlı N. eds. In: *Arthropodoloji*. Birinci Baskı. Ankara: Medisan Yayınevi 2015; ss. 95-114.

Sorumlu Yazar:

Dr. Öğr. Üyesi Sami GÖKPINAR
Kırıkkale Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Parazitoloji Anabilim Dalı
Kırıkkale- TÜRKİYE
Tel: 0318 3574242/6430
E-posta: samigokpinar@kku.edu.tr

Yazım Kuralları

1. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'nde veteriner bilimlerini ilgilendiren alanlarda orijinal araştırmalar, olgu sunumları, araştırma notları, kısa bildiri, derleme ve editöre mektup yayımlanır.
2. Bütün eserler yayın kurulunun ve danışma kurulunun onayından geçtikten sonra yayımlanır.
3. Dergide yayımlanacak yayımlar için resmi dil Türkçe'dir. İngilizce yazılmış eserler de yayımlanabilir. **İngilizce hazırlanmış makalelerin yayımlanmasına öncelik verilir.**
4. Yayımlar A4 tipi formatta, çift aralık, Arial ve 10 punto olarak yazılmalıdır. Her kenardan 2.5 cm boşluk bırakılarak, sayfaların sağ altına numara verilmelidir. Resimler, şekiller ve kaynaklar dâhil orijinal makaleler 14, derlemeler 14, olgu sunumları, araştırma notu ve kısa bildiriler 7 sayfayı geçmemelidir.
5. Daha önce kongrelerde tebliğ edilmiş ve özeti yayımlanmış çalışmalar, bu özelliği belirtilmek üzere kabul edilebilir. Araştırma herhangi bir kuruluş tarafından desteklenmiş ise makalenin başlığının son kelimesi üzerine yıldız (*) konularak kapak sayfasında dipnot olarak belirtilir.
6. Etik kurul onayı gerektiren çalışmalarda Etik Kurul onayı alınan kurumun adı ve onay numarası Gereç ve Yöntem kısmında belirtilmelidir.
7. Araştırma makalesi; Kapak Sayfası - Türkçe Özet - Anahtar kelimeler - İngilizce Özet (Summary) - İngilizce Anahtar Kelimeler (Key words) - Giriş - Gereç ve Yöntem - Bulgular - Tartışma ve Sonuç - Teşekkür - Kaynaklar - Tablo ve Şekiller - Sorumlu yazar (Correspondence) bölümlerini içerecek şekilde düzenlenmelidir. Metin içindeki tüm başlıklar koyu yazılmalıdır. Metin içinde paragraf girintisi yapılmamalı, devamlı satır numarası verilmelidir. Sayfa numaraları sağ alt köşeye yazılmalıdır.
8. Kapak sayfasında sadece Türkçe makale başlığı (koyu ve ilk harfleri büyük), İngilizce başlık (ilk harfler büyük), kısa başlık (40 karakteri geçmemeli ve ilk kelimenin ilk harfi büyük, diğerleri küçük olarak yazılmalıdır), yazar adları (unvansız), çalıştıkları kuruma ait bilgiler (soyadı üstüne numara konulup dipnot olarak, unvansız) verilmelidir.
9. Türkçe ve İngilizce özetler kapak sayfasından sonraki sayfaya yazılmalıdır. Özet kısımları makale başlığı, çalışmanın amacı, gereç ve yöntem, bulgular ve çalışmada varılan sonuçları içerecek şekilde hazırlanmalıdır. Özet metni, makale başlığı (kelime baş harfleri büyük, diğer harfler küçük olacak şekilde ve ortalı ve bold biçimde) yazıldıktan sonra başlığın altında en fazla 250 kelime olmalıdır. Paragraf yapılmamalıdır. Özet kısmında kısaltma kullanılacaksa, kısaltmalar ilk kez kullanıldığında açık olarak yazılmalı, daha sonra özet içinde hep aynı kısaltma kullanılmalıdır. İngilizce Özet (Summary): İngilizce makale başlığı (kelime baş harfleri büyük, diğer harfler küçük olacak şekilde ve ortalı ve bold biçimde) yazıldıktan sonra başlığın altında en fazla 250 kelime olmalıdır. Paragraf yapılmamalıdır. Özet kısmında kısaltma kullanılacaksa, kısaltmalar ilk kez kullanıldığında açık olarak yazılmalı, daha sonra özet içinde hep aynı kısaltma kullanılmalıdır. Anahtar Kelimeler: Türkçe ve İngilizce olarak özetlerin altına, alfabetik sıra ile ilk kelimenin baş harfi büyük, diğerleri küçük harfle (özel isimler baş harfi büyük) en fazla 5 kelime olarak yazılmalıdır. Anahtar kelimelerin Türkiye Bilim Terimleri'nden seçilmesine özen gösterilmelidir.
10. Giriş bölümünde çalışma ile doğrudan ilişkili kısa literatür bilgisi verilmeli, bu kısmın son paragrafına çalışmanın hipotezi ve amacı yazılmalıdır. Bu bölüm 2 sayfayı geçmemelidir.
11. Kullanılacak alt başlıklar paragraf girintisi yapılmadan *italik*, ikinci alt başlıklar normal yazı tipinde olacak şekilde hazırlanmalıdır.
12. Bulgular; kısa, öz ve anlaşılır bir şekilde yazılmalıdır. Tablolarda gösterilen verilerin tekrar yazılmasından kaçınılmalıdır. Kullanılacak alt başlıklar paragraf girintisi yapılmadan *italik*, ikinci alt başlıklar normal yazı tipinde olacak şekilde hazırlanmalıdır. Tablo ve şekillerin metinde geçeceği yer, altı ve üstü çizgili olarak belirtilmelidir.
13. Tartışma ve Sonuç bölümüne, çalışmadan çıkarılan sonuçlar ve yargıları içeren kısa bir sonuç paragrafı eklenmelidir.
14. Kısaltmalar ilk kez kullanıldığında açık olarak yazılmalı daha sonra makale içinde hep aynı kısaltma kullanılmalıdır. Ondalık ifadeler nokta kullanılmalıdır.
15. Yazı içinde geçen tür isimleri ve anatomik terimler gibi Latince ifadeler *italik* karakterle yazılmalıdır. Tüm ölçü birimleri SI (*Système Internationale*)'e göre verilmelidir.
16. Tablo ve şekil başlıklarının yalnızca ilk harfleri büyük olmalıdır. Tablolar kaynaklar kısmından sonra, her bir tablo ayrı sayfada olacak şekilde verilmelidir. Tablo başlıkları **Tablo 1.** şeklinde numaralandırılmalıdır. Tablolarda iç ve yan kılavuz çizgiler kullanılmamalıdır. Tablo yazısı tablonun üstüne yazılmalı, tabloda geçen kısaltmalar tablo altında belirtilmelidir.
17. Her resim, grafik ve çizim; şekil olarak kabul edilip **Şekil 1.** gibi yazılmalı, her biri ayrı sayfada olacak şekilde verilmelidir.
18. Resimler 300dpi çözünürlükte olmalıdır. Resimlerin fotokopisi kabul edilmemektedir. Kullanılan resimlerin dergide renkli basılmasının istenilmesi durumunda ücret talep edilecektir.
19. Derlemeler, orijinal olması, en son yenilikleri içermesi, yazarların konu ile doğrudan ilişkili **en az 3 adet** çalışmalarının olması ve bunların derleme içinde kullanılması durumunda yayınlanmak üzere kabul edilebilecektir. Derlemeler kapak sayfası, Türkçe Özet - Anahtar kelimeler - İngilizce Özet (Summary) - İngilizce Anahtar Kelimeler (Key words) - Giriş, konunun kendine ait alt başlıkları, Sonuç, Kaynaklar, Tablo ve Şekiller ve Sorumlu yazar (Correspondence) bölümlerini içerecek şekilde düzenlenmelidir. Derlemelerde kullanılacak alt başlıklar paragraf girintisi yapılmadan *italik*, ikinci alt başlıklar normal yazı tipinde olacak şekilde hazırlanmalıdır.
20. Olgu Sunumları, Türkçe Özet - Anahtar kelimeler - İngilizce Özet (Summary) - İngilizce Anahtar Kelimeler (Key words) - Giriş - Olgu(lar) - Tartışma ve Sonuç - Kaynaklar - Tablo ve Şekiller ve Sorumlu yazar (Correspondence) bölümlerini içermelidir. Kullanılacak alt başlıklar paragraf girintisi yapılmadan *italik*, ikinci alt başlıklar normal yazı tipinde olacak şekilde hazırlanmalıdır.
21. Metin içinde belirtilen tüm kaynaklar "Kaynaklar" listesinde yer almalıdır. Kaynaklar yazılırken alfabetik sıraya konulmalı, noktalama işaretlerine örneklerde gösterildiği şekilde dikkat edilmeli ve yazı içinde her kaynağa ait numara ilgili olan cümlelerin sonunda parantez içinde mutlaka belirtilmelidir. Dergi kısaltmaları *Index Medicus* ile uyum içerisinde olmalıdır. Araştırma makalelerinde en fazla 30, derlemelerde 45 ve olgu sunumlarında ise 15 kaynak kullanılmalıdır.
22. Kaynaklar;
 - 22.1. Kaynak süreli yayın ise; yazar(lar)ın soyad(lar)ı ve isim(ler)inin baş harf(ler)i, makale ismi, dergi ismi, yıl, cilt (olması durumunda), sayı ve sayfa numaraları belirtilmelidir. Örnek: Kaldhone P, Nayak R, Lynne AM, Dvaid DE, McDermott PF. Characterisation of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from Turkey-associated sources. Appl Environ Microbiol 2008; 74(16): 5038-46.
 - 22.2. Kaynak editörlü kitap bir bölüm ise; yazar(lar)ın soyad(lar)ı ve isim(ler)inin baş harf(ler)i, bölüm ismi, editör soyad(lar)ı ve isim(ler)in baş harfi, kitap ismi, kaçınıcı baskı olduğu, baskı yeri, yayınevi adı, basım yılı ve sayfa numara(lar)ı belirtilmelidir. Örnek: Hornbeck P. Assay for antibody production. Colign JE, Kruisbeek AM, Margules DH. eds. In: Current Protocols in Immunology. New York: Greene Publishing Associates, 1991; pp. 105-32.
 - 22.3. Kaynak kitap ise; yazar(lar)ın soyad(lar)ı ve isim(ler)inin baş harf(ler)i, kitap ismi, kaçınıcı baskı olduğu, baskı yeri, yayınevi adı, basım yılı ve sayfa numara(lar)ı verilmelidir. Örnek: Fleiss JL. Statistical Methods for Rates and Proportions. Second Edition. New York: John Wiley and Sons, 1981; p.103.
 - 22.4. Kaynak editörlü kitap ise; yazar(lar)ın soyad(lar)ı ve isim(ler)inin baş harf(ler)i, eds kısaltması, kitap ismi, kaçınıcı baskı olduğu, baskı yeri, yayınevi adı, basım yılı ve sayfa numara(lar)ı verilmelidir. Örnek: Balows A, Mousier WJ, Herramaf KL, eds. Manual of Clinical Microbiology. Fifth Edition. Washington DC: IRL Press, 1990; p. 37.
 - 22.5. Kaynak kongre bildirisi ise; yazar(lar)ın soyad(lar)ı ve isim(ler)inin baş harf(ler)i, bildiri ismi, kongre adı, kongrenin yapıldığı ay ve tarih, yıl, şehir ve ülke bilgileri verilmelidir. Örnek: Entrala E, Mascarp C. New structural findings in *Cryptosporidium parvum* oocysts. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII). October, 10-14, 1994; İzmir-Türkiye.
 - 22.6. Tezler;
 - 22.7. Kaynak tez ise; yazarın soyadı ve isminin baş harfi, tezin ismi, tezin türü, enstitü ismi, şehir, tezin kabul yılı ve sayfa numara(lar)ı belirtilmelidir. Örnek: Erdem V. Köpek göz hastalıklarında klinik oftalmoskopik ve ultrasonografik bulguların değerlendirilmesi, Doktora tezi, Ankara Üniv Sağlık Bil Ens, Ankara 2003; s. 1-2.
 - 22.8. Kaynak internete bulunan bir web sitesi ise, yazar(lar)ın soyad(lar)ı ve isim(ler)inin baş harf(ler)i, (yazar adı yoksa web sitesinin veya kaynağının adı) yazılır. Daha sonra

sırasıyla yılı, makalenin adı, varsa yayıncı, internet adresi ve erişim tarihi belirtilir. Kaynak olarak web siteleri kullanılacak ise sınırlı sayıda olmasına ve resmi web sitelerinin kullanılmasına özen gösterilmelidir.

Örnek: Mevzuatı Geliştirme ve Yayın Genel Müdürlüğü Mevzuat Bilgi Sistemi, 30.06.2013, Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği, Türkiye Cumhuriyeti Başbakanlık, <http://www.mevzuat.gov.tr/Metin.Aspx?MevzuatKod=7.5.18532&MevzuatIliski=0&sourceXmlSearch=katki>, Erişim tarihi: 23.02.2016.

23. Eserler dergide yayımlandıktan sonra, bütün sorumluluk sahiplerine aittir.

24. Yazılar gönderilirken son kontrol listesi izlenecek ve yayın hakkının devri sözleşmesi tüm yazarlarca isim sırasına göre imzalanacaktır. **Yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmayan ve yayın hakkı devir sözleşmesi bulunmayan yayınlar işleme alınmayacaktır.**
25. Yazılar, ercvet@gmail.com adresine gönderilmelidir. Yazışmalar için, makale sonunda ayrı bir sayfada, yazar adı, unvanı yazılıp, haberleşme adresi, telefon, fax numarası ve e-mail adresi yazılmalıdır.

Instructions to Authors

1. The Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University publishes original papers, short communications, case reports, letter to editor and original review articles related to the field of Veterinary Medicine.
2. Editorial board and advisory committee must prove all manuscripts before considered publication.
3. Formal language of manuscripts is Turkish. However, manuscripts in English, German, and French are also accepted. And the beginning of the manuscript must contain the Turkish and English summaries.
4. Original manuscripts must be typed in Word program and e-mail to ercvet@gmail.com.
Manuscript must contain a separate page (as a last page of the manuscript) including the corresponding author's name, his/her title, communication address, phone number, fax number, and e-mail address.
5. Original papers and reviews should normally not exceed 12 and 15 pages respectively. Case reports, research notes and short communications also should not exceed 6 pages including tables and figures. Manuscripts must be printed A4 papers. Font size must be 10 pt (Arial) and legible. Manuscripts must be type written with double spacing and wide margins (3cm each side). All pages must be numbered consecutively.
6. Studies were partially presented in a national or international meeting or published as an abstract in any journal can be published with indication of this status at the bottom of the page (footnote). In the same page, information should be included on any institutions or individuals who financially contributed to the work. This information must be showed in the running title of the manuscript as an asterisk also seen at the bottom of the page (footnote).
7. Copyright Release form must be filled and signed by all authors. Final checklist should also be followed.
8. The manuscript must be submitted with Animal Care and Use Committee report if the work requires.
9. Manuscript must be organized as follows: Summary (Turkish and English), Key Words, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion and Conclusion, Acknowledgements, References, Tables, Figures, Charts, Graphs and Photographs and their explanations. All titles of sections must start with capital letter and be bold. Paragraphs in the text should not indented, but lines should be numbered.
10. The cover page should be supplied as a separate page and include: running title, max 40 characters in English with the first letters capital, the name(s) of the author(s) without titles, affiliations and complete postal address of all author(s). Superscript numbers should be given to the surnames of authors as affiliation information.
11. The title page must contain the Turkish and English summaries (up to 200 words) with no paragraph and not more than five Key Words in Turkish and English. Key Words must be placed below summary with an alphabetical order. Only the first Key Word must start with a capital letter.
12. Abbreviations should be defined when first used and be consistent throughout the text.
13. Names of tables and figures must be given in a separate page. Through the manuscript, tables and figures must be replaced a proper place and contain descriptive information related to the table or figure. Descriptive information must be placed above the tables but below the figures in the text with any explanations or footnotes below. Title of figure and photographs must be numbered in order as figure 1, figure 2 or so. Each page must contain no more than one figure or table. Figures must be suitable for high quality print. Line drawings should be printed by laser or inkjet printer. Lines in tables should be hidden.
14. All cited works in the text must be present in literature section. References must be assembled alphabetically. In the text, they should be referred with numbers. Places must be indicated within the text. Periodicals, books, multi author books, chapter of a book and other references must be given as follows: Journal titles should be abbreviated according to the Index Veterinarius.
15. Species names and anatomical terms in Latin should be italicized. All measurement specifications must follow the SI (Système Internationale) units.
16. Photographs must be of good quality, black and white and printed on glossy paper. Photocopies of photographs are not acceptable. Color photographs are accepted but the contributor must meet money charge. Also, if color photographs are desired or necessary all needed material must be provided. Photographs should be clearly marked on the reverse side with the number, author's name and orientation (top), use a soft pencil.
17. Review articles are considered for publications if they are original and contain recent developments. Reviews contain title as in research manuscripts, summary, introduction, subtitles appropriate for the review, result and literature cited. Key Words are also added.
18. Case reports must contain Summary, Key Words, Introduction, Case(s), Results and Discussion, and Literature cited.
19. Literature;
- 19.1. If the source is a periodical, citation must be done as shown below example: Kaldhane P, Nayak R, Lynne AM, Dvaid DE, McDermott PF, Logue CM, Foley SL. Characterisation of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from turkey-associated sources. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(16): 5038-46.
- 19.2. If the source is from chapter of a book with an editor, citation must be done as shown below example: Hornbeck P. Assay for antibody production. Colign JE, Kruisbeek AM, Marguiles DH. eds. In: *Current Protocols in Immunology*. New York: Greene Publishing Associates, 1991; pp. 105-32.
- 19.3. If the source is a book, citation must be done as shown below example: Fleiss JL. *Statistical Methods for Rates and Proportions*. Second Edition. New York: John Wiley and Sons, 1981; p.103
- 19.4. If the source is whole book with an editor, citation must be as below example: Balows A, Mousier WJ, Herramaf KL, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Fifth Edition. Washington DC: IRL Press, 1990; p. 37.
- 19.5. If the source is from meeting, citation must be done as shown below example: Entrala E, Mascarp C. New structural findings in *Cryptosporidium parvum* oocysts. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII). October, 10-14, 1994; İzmir-Türkiye.
- 19.6. If the source is from a thesis, citation must be done as shown below example: Erakinci G. Investigation of Antibodies Against Parasites in Blood Donors. PhD Thesis. Ege Univ. Institute of Health Sciences. Parasitology Program, İzmir-Turkey, 1993.
- 19.7. The source is a website on the internet, the initials of the authors' surnames and names (if there is no name of author the name of the website or of the source) are written. Then the years and title of the article, Publisher (if any), internet address and arrival date are specified in this order.
If websites are to be used as source, care must be taken to keep it limited and the website to be official.
Example: TUIK. Hayvancılık İstatistikleri. http://www.tuik.gov.tr/hayvancilik_app/hayvancilik_zul; Accessed Date: 14.03.2010.
20. Once the studies one published in the journal, all the responsibility belongs to the authors.

TELİF HAKKI DEVRİ / COPYRIGHT RELEASE
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ / JOURNAL OF FACULTY OF
VETERINARY MEDICINE, ERCIYES UNIVERSITY

Makale Türü/ Article Type:

.../.../20..

(...) Araştırma / Research (...) Derleme / Review (...) Kısa Bilimsel Çalışma / Short Communication

(...) Olgu Sunumu / Case Report (...) Editöre Mektup / Letter to Editor

Makale Başlığı/Article

Entitled:.....
.....
.....

Sayın Editör,

- Yayınlanması dileğiyle Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne gönderdiğimiz makalenin yazarları olarak;
- 1- Derginizde yayımlanmak üzere yollamış olduğumuz makalenin orijinal olduğunu; bilimsel ve etik sorumluluğunun bize ait olduğunu,
 - 2- Makalenin; daha önce yayımlanmadığını, derginizdeki değerlendirme sürecinde başka bir yayın organına yayımlanmak üzere gönderilmediğini ve gönderilmeyeceğini,
 - 3- Makalenin; kişilik ve telif haklarına aykırı kanun dışı maddeler içermediğini,
 - 4- Gerekli görülen düzeltmelerle birlikte her türlü yayın hakkını, yazının yayımlandığı günden itibaren Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne ait olduğunu kabul ve beyan ederiz.

Dear Editor,

Here we affirm and warranty as the Author(s) of this manuscript submitted to Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University that;

- 1- The manuscript /We submitted to the Bulletin is original and responsibilities belong to us ethically and scientifically,
- 2- The manuscript has not been previously published, being considered for publication by any other journal and will not be submitted to any other journal for such review while under evaluation by this bulletin,
- 3- The manuscript contains no unlawful statements and does not contain any materials that violate any personal or proprietary rights.
- 4- The Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University reserves all rights with due corrections from the date it has been published onwards.

Yazar/ Yazarların Adı

Author's/Authors' Printed Name

1).....İmza/Signature:.....

2).....İmza/Signature:.....

3).....İmza/Signature:.....

4).....İmza/Signature:.....

5).....İmza/Signature:.....

Not/Note: Formu aşağıdaki adrese,e-mail ya da posta yolu ile gönderiniz veya elden teslim ediniz./ Please send this form to the address below by e-mail, post or deliver personally.

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi / Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi Editörlüğü, 38039, Melikgazi-KAYSERİ / TÜRKİYE
Tel/Phone: 0352 339 94 84 Faks/Fax: 0352 337 27 40 e-posta/e-mail: ercvet@gmail.com

SON KONTROL LİSTESİ

Makalenizi göndermeden önce lütfen bu bölümdeki maddelerle karşılaştırma yapınız ve eksiklikleri gideriniz.

- Eksiksiz doldurulmuş ve bütün yazarlarca imzalanmış “**Telif Hakkı Devri Formu**” (<http://ercvet.gmail.com> adresinden ulaşabilirsiniz) makale ile birlikte gönderildi.
- Metnin tamamı çift aralıklı (5 mm) yazıldı (özetler, tablolar, şekil alt yazıları, kaynaklar v.d. dahil).
- Her bir kenarda 2,5 cm boşluk bırakıldı.
- Yazılar 10 punto (Arial) ile yazıldı.
- Satır numaraları verildi.
- Kapak sayfasında, makalenin başlığı (sadece yazım dilindeki) koyu (bold) yazıldı, kısa başlık eklendi.
- Kapak sayfasında, yazar isimleri açık olarak yazıldı (kısaltma yok).
- Kapak sayfasına dipnot (varsa) eklendi.
- Türkçe başlık yazıldı.
- Türkçe özet yazıldı.
- Türkçe anahtar kelimeler (alfabetik sıralı ve ilk kelimenin ilk harfi büyük diğerleri küçük harfle yazıldı) verildi.
- İngilizce başlık yazıldı.
- İngilizce özet yazıldı.
- İngilizce anahtar kelimeler verildi.
- Şekillerin orijinal halleri eklendi.
- Metin içinde şekiller ardışık numaralandı.
- Şekil boyutları min.=8x20; max.=16x20 cm.
- Metin içinde tablolar ardışık numaralandı.
- Tablo boyutları min.=8x20 cm; max.=16x20 cm.
- Şekil ve tabloların metin içinde gelmesi istenilen yer belirtildi.
- Şekiller listesi ayrı bir sayfa olarak hazırlandı.
- Her şekil ayrı sayfaya yerleştirildi.
- Tablolar listesi ayrı bir sayfa olarak hazırlandı.
- Her tablo ayrı sayfaya yerleştirildi.
- Kaynaklar yazım kurallarına uygun yazıldı.
- Yazışma adresi verildi.

FINAL CHECKLIST

Before you submit your work, please take the time to be certain that your paper (and other writings as applicable) is in the correct format and that you have included everything necessary by checking it against this checklist.

- Copyright Release Form has been enclosed, completed and signed by all authors (<http://ercvet.gmail.com>).
- Entire paper has been 5 mm double-spaced (abstract, tables, captions/legends, references).
- Margins have been 2,5 cm each side.
- Font size has been 10 pt (Arial).
- Lines have been numbered.
- Title of the manuscript has been written bold and short title added on the cover page.
- Author(s) names have been fully written (not abbreviated) on the cover page.
- Footnote has been given on the cover page (if necessary)
- English title has been given.
- English summary has been given.
- English keywords have been given alphabetically.
- Turkish title has been given.
- Turkish summary has been given.
- Turkish keywords have been given alphabetically.
- Original figures have been enclosed.
- Original figures have been prepared correctly according to instructions.
- Figures have been referred to consecutively in the paper.
- Dimensions of figures have been min =8x20 cm; max.=16x20 cm.
- Tables have been referred to consecutively in the paper.
- Dimensions of tables have been min =8x20 cm; max.=16x20 cm.
- Figures and tables have been stated requiring put on the manuscript.
- Names of figures have been given on a separate page as figure list.
- Each figure has been given on a separate page.
- Names of tables have been given in a separate page as table list.
- Each table has been given on a separate page.
- References has been typed according to instructions.
- Corresponding address has been given.